Zur Selektion Cytochromoxidase-deficienter Mutanten von Neurospora crassa

Untersuchungen an einer neuen cytoplasmatischen Mutante (sas-1)

Klaus-Peter Bruckmooser

1979

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Aus dem Institut für
Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie
und Zellbiologie
der Universität München

Vorstände: Prof. Dr.Dr. Th. Bücher, Prof. Dr. M. Klingenberg, Prof. Dr. F. Miller, Prof. Dr. H.G. Zachau

Zur Selektion Cytochromoxidase-deficienter Mutanten von Neurospora crassa
Untersuchungen an einer neuen cytoplasmatischen Mutante (sas-1)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Klaus-Peter Bruckmooser
aus München

München 1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. S. Werner
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Th. Bücher
Dekan: Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 18. Mai 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Erika Marianne

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von November 1975 bis Dezember 1976 am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr.rer.nat. Dr.med.h.c. Theodor Bücher und Herrn PD Dr.med. Sigurd Werner.

Herrn Prof. Dr. Bücher bin ich für die freundliche Aufnahme in seinem Institut und die großzügige Förderung dieser Arbeit, Herrn PD Dr. Werner für das große Interesse und seine stetige Unterstützung zu besonderem Dank verpflichtet.
Weiterhin möchte ich Herrn PD Dr. G. von Jagow für die Aufnahme der Tieftemperaturspektren und Herrn Dr. H. Bertrand für die Betreuung bei den genetischen Untersuchungen danken.
Herzlich gedankt sei an dieser Stelle auch Frau M. Krammer und Frau M. Neuner-Wild für ihre große Hilfsbereitschaft sowie Frau G. Lusch für die Anfertigung der Abbildungen.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG 1

2. ERGEBNISSE 3

2.1. Mutagenese und Selektion von Cytochromoxidase-deficienten Mutanten 3

2.1.1. Mutation 3

2.1.2. Selektion 3

2.2. Untersuchung über die Vererbung des genetischen Defektes in sas-1 10

2.3. Morphologische Untersuchung von sas-1 12

2.4. Biochemische Untersuchungen an sas-1 14

2.4.1. Wachstum der Mutante 14

2.4.2. Messung des Sauerstoffverbrauchs von ganzen Zellen 15

2.4.3. Cytochromgehalt von sas-1-Mitochondrien 17

2.4.4. Enzymaktivitäten in sas-1-Mitochondrien 19

2.4.5. Elektrophoretische Auftrennung der gesamten mitochondrialen Membranproteine 20

2.4.6. Mitochondriale Translationsprodukte 21

2.4.7. Untereinheiten von Cytochromoxidase und Häm a -Gehalt 22

2.4.8. RNA-Gehalt der Mitochondrien und mitochondriale Ribosomen 25

2.4.9. Einfluß der Wachstumstemperatur auf die $CN^{\ominus}$-insensitive Atmung und den Cytochromgehalt 27

3. DISKUSSION 32

3.1. Mutagenese und Selektion 32

3.2. Vergleich der untersuchten Eigenschaften von sas-1 mit den Cytochromoxidase-defi-cienten Mutanten mi-1 und cni-1 35

4. EXPERIMENTELLER TEIL 38

4.1. Mutagenese und Selektion 38

4.1.1. Mutagenese 38

4.1.2. Selektion 38

4.1.2.1. Selektion durch selektive Wachstumshemmung 38

4.1.2.2. Selektion durch Kolonienwachstum und Überschichten mit Tetrazolium-haltigem Agar 39

4.1.3. Isolieren der Kolonien 39

4.2. Genetische Untersuchung 39

4.2.1. Kreuzung 39

4.2.2. Tetradenanalyse 40

4.3. Biochemische Untersuchungen 40

4.3.1. Züchtung der Mutante 40

4.3.2. Extraktion des Biuret-positiven Proteins 41

4.3.3. Messung des Sauerstoffverbrauchs 41

4.3.4. Präparation von Mitochondrien 42

4.3.5. Cytochromspektren der Mitochondrien 43

4.3.6. Enzymaktivitäten 44

4.3.6.1. Enzymatische Aktivität der Cytochromoxidase 44

4.3.6.2. Enzymatische Aktivität der ATP-ase 44

4.3.7. Markierung der Zellproteine und der mitochondrialen Translationsprodukte 45

4.3.8. Mitochondriale Translationsprodukte und Immunpräzipitation 45

4.3.9. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 46

4.3.10. Extraktion von Häm a und Protohäm aus Mitochondrien 47

4.3.11. Bestimmung des RNA-Gehaltes der Mitochondrien 48

4.3.12. Präparation von mitochondrialen Ribosomen und ribosomalen Untereinheiten 48

4.3.13. Proteinbestimmung 50

4.3.14. Materialien 51

5. ZUSAMMENFASSUNG 52

6. LITERATURVERZEICHNIS 54

1. EINLEITUNG

An der Proteinsynthese eukaryoter Zellen ist neben dem nukleären Genom auch die extrachromosomale DNS der Mitochondrien beteiligt (1-3). Obwohl die mitochondriale DNS nur einen geringen Anteil (etwa 5% (4,5)) des gesamten mitochondrialen Proteins codiert, scheinen diese von den Mitochondrien selbst synthetisierten Proteine eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion zu spielen.

Die Cytochromoxidase ist ein in der inneren Mitochondrienmembran gelegener supramolekularer Enzymkomplex, der sich aus mindestens sieben Polypeptid-Untereinheiten zusammensetzt. Drei Untereinheiten des Enzyms wurden als Produkte der mitochondrialen Proteinsynthese identifiziert (6-8). Für die Untersuchung des Zusammenbaus eines solchen Komplexes müssen Wege gefunden werden, die es erlauben, sowohl die Produktion der Einzelbestandteile als auch ihren Transport sowie die Assemblierung zum funktionsfähigen Enzym zu verfolgen. Dabei kann von zwei unterschiedlichen Ansatzpunkten ausgegangen werden:

1) Kurzlebige Zwischenprodukte der Enzym-Bildung werden unter physiologischen Bedingungen am Wildtyp erfaßt,
2) Langlebige Produkte der Assemblierung werden nach gezielter Störung des Zusammenbauprozesses auf mehreren Ebenen untersucht.

Ein ungenügender oder fehlerhafter Zusammenbau von Vorstufen zu einem Proteinkomplex liegt offensichtlich bei vielen Cytochromoxidase-deficienten Mutanten vor (9,10). Sie eignen sich somit, abhängig vom genetischen Defekt, als spezifische Werkzeuge zur Identifizierung schwer erfaßbarer Zwischenstadien des Zusammenbaus.

Dieser experimentelle Ansatzpunkt setzt jedoch die Verfügbarkeit geeigneter Mutanten voraus; sie müssten im wesentlichen folgende Eigenschaften aufweisen:

1) Die Mutation sollte sich in einer Störung auf regulatorischer Ebene auswirken,

2) Der Enzymdefekt sollte unter bestimmten experimentellen Bedingungen reversibel sein.

Es wurden bereits einige Kernmutanten isoliert, die diese Kriterien zumindest zum Teil erfüllen (11-13).

Um den Beitrag des mitochondrialen Genoms zur Regulation des Zusammenbauprozesses zu untersuchen, benötigt man eine größere Anzahl cytoplasmatischer Mutanten, die nach Möglichkeit über die beiden genannten Eigenschaften verfügen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, nach der Durchführung einer vorwiegend das mitochondriale Genom treffenden Mutagenese eine Selektionsmethode für Cytochromoxidase-deficiente Mutanten aufzustellen.

Als Untersuchungsobjekt diente der rote Brotschimmel (Neurospora crassa); er hat gegenüber anderen Organismen, insbesondere Hefe, folgende Vorteile:

- Neurospora crassa verfügt über eine zweite Sauerstoffbindende Endoxidase ("alternative oxidase") und ist deshalb nicht wie Hefe auf die Gärung angewiesen,
- Neurospora crassa wächst gut auf Minimalmedium, d.h. Markierungsexperimente sind durch Zugabe radioaktiv etikettierter Aminosäuren leicht möglich.

Aus der beschriebenen Problemstellung ergab sich folgender Arbeitsplan:

1) Erstellung der Selektionsmethode: Ausgehend von bekannten Techniken (Selektion mit Acetat (14) bzw. Tetrazolium (14)) sollte ein zusätzlicher, möglichst wirkungsvoller Schritt erarbeitet werden. Dabei musste geprüft werden, ob ein Hemmstoff der "alternative oxidase" dazu verwendet werden kann.
   Zusätzlich sollte ein effektives Screening-Verfahren zur raschen Beurteilung der selektierten Kolonien zur Verfügung stehen.
2) Vorläufige genetische und biochemische Charakterisierung einer ausgewählten Mutante: Im wesentlichen sollten mitochondriale Parameter, vor allem Cytochromoxidase und deren Bestandteile untersucht werden.

2. ERGEBNISSE

2.1. Mutagenese und Selektion von Cytochromoxidase-deficienten Mutanten

2.1.1. Mutagenese

Konidien des Wildtyps (74 A) von Neurospora crassa wurden in Gegenwart von Cycloheximid mit einer dem Adenin analogen Base, dem 2-Aminopurin, behandelt. Mit dieser Methode lassen sich mit großer Wahrscheinlichkeit cytoplasmatische Mutanten induzieren (15).

2.1.2. Selektion

Das ausgearbeitete Selektionsschema ist in Abb.1 dargestellt. Nach dem Einbau des Mutagens in Nucleinsäuren wurden die Zellen gesammelt und zur Entfernung von Cycloheximid und freiem Aminopurin gewaschen.

2.1.2.1. Selektion durch Acetat

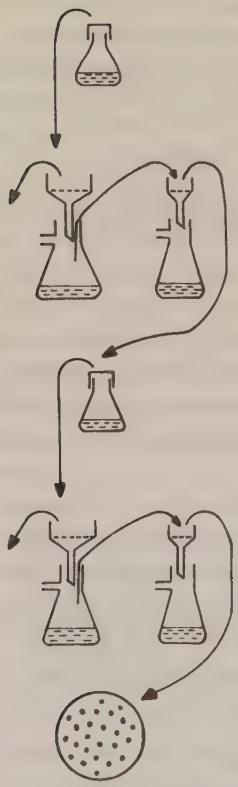
Anschließend wurden die Zellen in Vogel's Minimalmedium mit Acetat als Kohlenstoffquelle suspendiert und für 35 Stunden auf einem Schüttler inkubiert. Nach Entfernung des gewachsenen Mycels wurde der Vorgang mit den übriggebliebenen (sich nur äußerst langsam teilenden) Zellen wiederholt.

2.1.2.2. Selektion durch Salicylhydroxamat

Diejenigen Zellen, die sich in Acetat-haltigem Medium nicht weiter teilen (und ein Mycel bilden) konnten, wurden in Vogel's Minimalmedium mit Saccharose als Kohlenstoffquelle in Anwesenheit von Salicylhydroxamat (SHAM) für weitere 35 Stunden inkubiert. Das entstandene Mycel wurde wiederum entfernt und das Wachstum in Salicylhydroxamat-haltigem Medium so oft wiederholt (3-4mal), bis nahezu kein sichtbares Wachstum mehr feststellbar war.

In Abb.2 ist der Einfluß verschiedener Konzentrationen

Abb.1: Selektionsschema



Wildtyp (74 A)

Mutagenese

Acetat-Minimalmedium

sich teilende Zellen → Mycel (verwerfen)

sich nicht teilende Zellen → Zellen

Saccharose-Minimalmedium+SHAM

sich teilende Zellen → Mycel (verwerfen)

sich nicht teilende Zellen → Zellen

Ausstreichen auf Sorbose-Agar

Kolonien

Überschichten mit Tetrazoliumsalz-haltigem Agar

Isolieren Tetrazolium-negativer Kolonien

Weiteres Wachstum der Kolonien auf Vollmedium
Konidisation

Konidien+Saccharose-Minimalmedium

Mycel - Tieftemperaturspektrum

von Salicylhydroxamat auf das Wachstum zweier Cytochromoxidase-deficienter Mutanten (cni-1 und sas-1) und des Wildtyps gezeigt. Diese Mutanten bilden bei Salicylhydroxamat-Konzentrationen von 0,2 mM bis 4 mM wesentlich weniger Mycel als der Wildtyp.

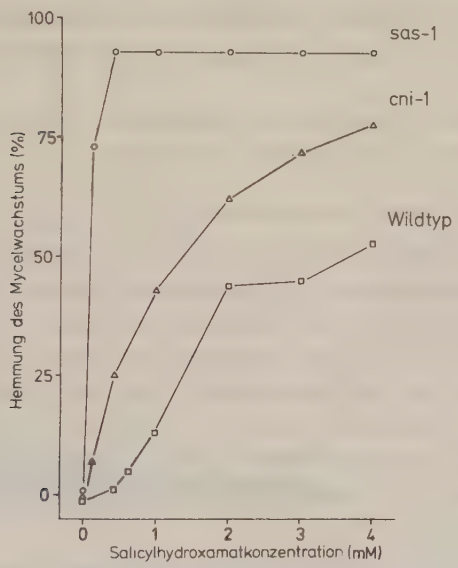


Abb.2: Hemmung des Wachstums von cni-1, sas-1 und Wildtyp durch Salicylhydroxamat. Die Kulturen wuchsen bei Raumtemperatur 35 Stunden (cni-1, sas-1) bzw. 24 Stunden (Wildtyp) in Saccharose-Minimalmedium mit verschiedenen Konzentrationen von Salicylhydroxamat. Die Wachstumshemmung wurde über das Trockengewicht des erhaltenen Mycels bestimmt.

2.1.2.3. Selektion durch Tetrazoliumsalz

Die nach diesen Selektionsschritten noch vorhandenen Zellen wurden durch Filtration gesammelt, nach Resuspendieren in Wasser auf Sorbose-haltige Nährböden ausgestrichen und für 2-3 Tage bei 25°C inkubiert. Durch den Zusatz von Sorbose wird ein kolonienförmiges Wachstum erreicht (14). Nach dem Überschichten der gewachsenen Kolonien mit Tetrazolium-haltigem Agar wurden die Petrischalen für

4 Stunden bei 40°C bebrütet.
Der größte Teil der Kolonien war leuchtend rot gefärbt, d.h. die Zellen reduzierten den Farbstoff (=Tetrazolium-positive Kolonien). Ein kleiner Teil der Kolonien war farblos oder auch blaßrot, d.h. die Zellen waren nicht in der Lage, den Farbstoff zu reduzieren (=Tetrazolium-negative Kolonien). Letztere wurden aus den Nährböden ausgestochen und in je ein Schrägagarröhrchen mit Vollmedium gegeben.
Die meisten Kolonien bildeten hier innerhalb weniger Tage ein dichtes Mycel und reichlich Konidien.

2.1.2.4. Selektion durch Spektralanalyse

Eine kleine Menge dieser Konidien diente als Inoculum für eine Flüssigkeitskultur mit Saccharose-Minimalmedium. Nach etwa 24-36 Stunden wurde ein Teil des Mycels in Wasser suspendiert, mit Dithionit versetzt und einige Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde die Probe mit Löschpapier kurz getrocknet, in die Bohrung eines Kunststoffobjektträgers (Abb.3) gepreßt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

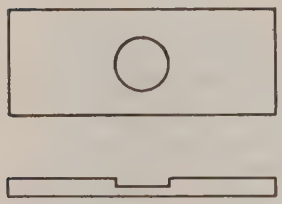
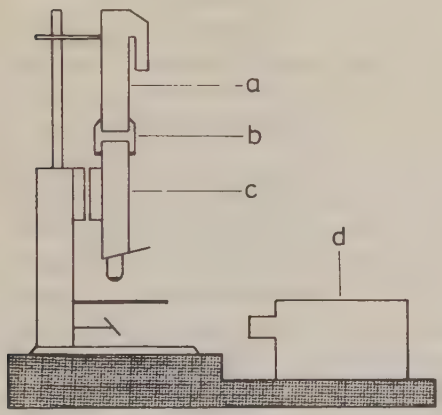


Abb.3: Objektträger aus durchsichtigem Kunststoff (Arylglas, 50x20x4 mm). Durchmesser der Bohrung 10 mm, Tiefe 2 mm.

Die Absorptionslinien der reduzierten Cytochrome (α-Bande) der eingefrorenen Proben wurden mit einer speziell dafür gebauten Vorrichtung beobachtet; sie besteht im wesentlichen aus drei Teilen: einem Handspektroskop, einem Mikroskop und einer Lichtquelle.
Abbildung 4A zeigt die Anordnung der Bestandteile in der Apparatur. Über dem Tubus eines Mikroskops (c), dessen Okular entfernt wurde, befestigte man mit einem Stativ ein Handspektroskop (a). Die Verbindung des Spektroskops

mit dem Tubus erfolgt über ein Kunststoffrohr (b), das der Rändelschraube für die Spaltverstellung des Spektroskops streng aufsitzt (siehe Abb.4 B). Durch Drehen des Rohres kann somit die Spaltbreite variiert werden. Das Objektiv (10x) des Mikroskops hat hier die Aufgabe eines Kondensors für das von der Probe ausgehende Licht. Als Lichtquelle dient eine Projektionslampe in einem Projektor (d).



a Spektroskop
b Kunststoffrohr
c Mikroskop
d Projektor

Abb.4 A: Anordnung von Handspektroskop, Mikroskop und Lichtquelle.

Abbildung 4B gibt den optischen Aufbau der Apparatur wieder (siehe nächste Seite).

Die optimale Beleuchtung der eingefrorenen Proben auf dem Objekttisch wird durch Abblenden am Kondensor des Mikroskops erreicht; die scharfe Abbildung der Spektrallinien erhält man durch Verstellung der Spaltbreite des Spektroskops.

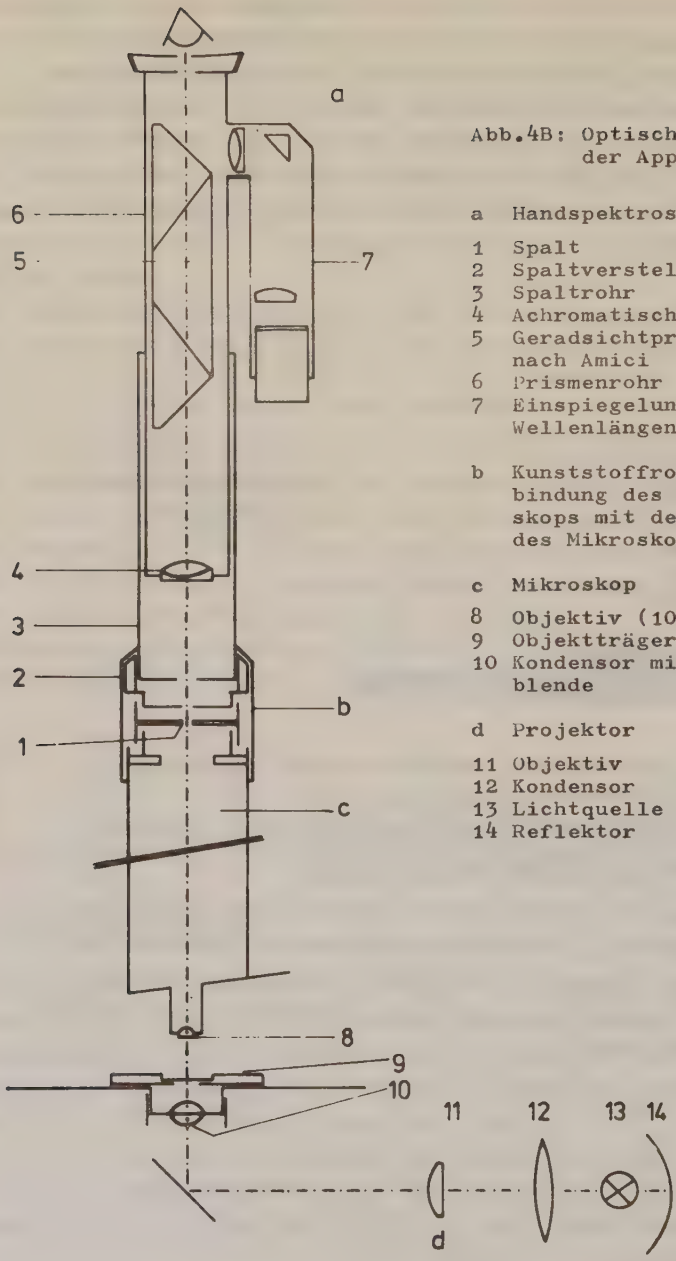


Abb.4B: Optischer Aufbau der Apparatur

a Handspektroskop

1 Spalt
2 Spaltverstellung
3 Spaltrohr
4 Achromatische Lupe
5 Geradsichtprisma nach Amici
6 Prismenrohr
7 Einspiegelung der Wellenlängenskala

b Kunststoffrohr zur Verbindung des Spektroskops mit dem Tubus des Mikroskops

c Mikroskop

8 Objektiv (10x)
9 Objektträger (s. Abb.3)
10 Kondensor mit Irisblende

d Projektor

11 Objektiv
12 Kondensor
13 Lichtquelle
14 Reflektor

In Abb.5 sind die beobachteten Absorptionsspektren vom Wildtyp und einer Cytochrom aa_3- und b-deficienten Mutante gezeigt.

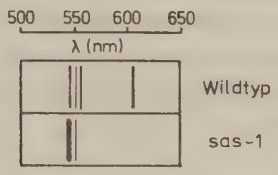


Abb.5: Absorptionsspektren vom Wildtyp und von sas-1

Das Absorptionsspektrum vom Wildtyp enthält drei scharfe Linien:

1) bei 546 nm: Cytochrom c
2) bei 556 nm: Cytochrom b
3) bei 605 nm: Cytochrom aa_3

Unter sehr guten Bedingungen (optimale Schichtdicke der Probe) kann man auch die Absorptionslinie von Cytochrom c_1 (552 nm) sehen.

Im Spektrum von sas-1 ist die Linie bei 546 nm sehr viel stärker ausgeprägt als in demjenigen vom Wildtyp, während die Linien bei 556 nm und 605 nm fehlen. Cytochrom c_1 (552 nm) ist unter optimalen Bedingungen gerade noch zu sehen.

Mit der hier beschriebenen Methode - Wachstum in Acetat-haltigem Medium, Wachstum in Saccharose-haltigem Medium in Gegenwart von Salicylhydroxamat, Selektion von Tetrazolium-negativen Kolonien und deren Spektralanalyse - wurden etwa 20 Salicylhydroxamat-sensitive (sas) Mutanten mit einer schwachen Absorptionslinie bei 605 nm isoliert; gleichzeitig war bei diesen Mutanten auch die Linie bei 556 nm wenig ausgeprägt. Bei einer Mutante fehlten beide Linien (sas-1).

Im folgenden wird diese Mutante genetisch, morphologisch und biochemisch untersucht.

2.2. Untersuchung über die Vererbung des genetischen Defektes in sas-1

Um festzustellen, ob der genetische Defekt von sas-1 im nukleären oder mitochondrialen Genom lokalisiert ist, wurde die Mutante mit einem Stamm mit normalem Cytochrommuster (Auxotrophiemutante pan-1) gekreuzt und anschließend eine Tetradenanalyse durchgeführt.

2.2.1. Kreuzung

Es wurden zwei Kreuzungen angesetzt:

1) Als "weiblicher" Partner diente pan-1, d.h. dieser Stamm bildete Protoperithezien, die mit Konidien von sas-1 -"männlicher" Partner- befruchtet wurden.
2) In der reziproken Kreuzung diente sas-1 als "weiblicher" und pan-1 als "männlicher" Partner.

Nach etwa 12 Tagen waren die Perithezien der ersten Kreuzung reif, während sas-1 in der reziproken Kreuzung keine Protoperithezien bildete. Die Mutante vermochte auch auf mit Glycerin und Hefeextrakt angereichertem Kreuzungsmedium keine Protoperithezien auszubilden.

2.2.2. Tetradenanalyse

Die Ascosporen aus der ersten Kreuzung wurden, wie im Experimentellen Teil beschrieben, isoliert. Jede Spore wurde in ein kleines Reagenzglas mit Nährboden gegeben. Nach einem Hitzeschock bei 60°C keimten die meisten isolierten Sporen aus, bildeten ein Mycel und Konidien, die in kleiner Menge als Inoculum für Flüssigkeitskulturen verwendet wurden.

Die Cytochromausstattung jedes Mycels, das letztlich von je einer Ascospore stammte, wurde wieder mit dem Handspektroskop untersucht. Alle Sporen aus drei vollständigen Tetraden keimten zu einem Mycel mit dem Cytochrommuster vom Wildtyp (pan-1) aus. Das beobachtete Merkmal, die Absorptionslinie von Cytochrom aa_3 bei 605 nm, war in jeder Tetrade im Verhältnis 8:0 ausgebildet.

Dieses Ergebnis spricht sehr dafür, daß der genetische Defekt in sas-1 extrachromosomal vererbt wird und somit im mitochondrialen Genom liegt.

2.2.3. Überprüfung der Vollständigkeit der Tetraden

Die Vollständigkeit der drei Tetraden wurde mit zwei chromosomal vererbten Merkmalen
1) der Auxotrophie für Pantothensäure und
2) dem Paarungstyp (sas-1 A, pan-1 a) untersucht.

ad 1) In jedem der acht Reagenzgläser (Abb.6 A) mit Saccharose-Minimalmedium (keine Supplementierung mit Pantothensäure) als Nährmedium wurden wenige Konidien von je einer Ascospore suspendiert und einige Tage bei 25°C bebrütet.
Abb.6 A zeigt, daß nur in 4 Gläsern ein Wachstum zu beobachten war. Das entspricht einer Aufspaltung des Merkmals Auxotrophie im Verhältnis 4:4.

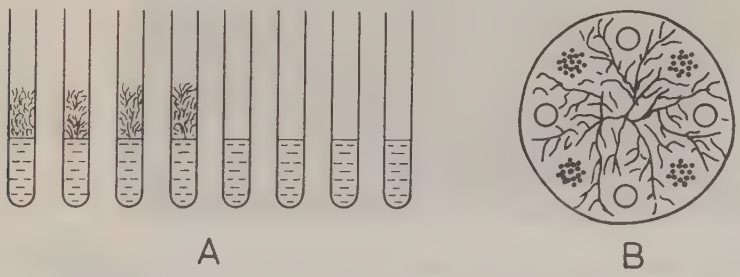


Abb.6: Versuche zur Überprüfung der Vollständigkeit der Tetraden.

ad 2) In einem analogen Versuch bildete pan-1 auf einer Agarplatte (Abb.6 B) Protoperithezien; sie wurden mit Konidien von je einer Ascospore an je einer der acht eingezeichneten Stellen befruchtet.
Abb.6 B zeigt, daß nur an 4 Stellen Perithezien gebildet wurden. Das Merkmal Paarungstyp spaltet also auch im Verhältnis 4:4 auf.

Die drei untersuchten Tetraden müssen deshalb aus je einem Ascus stammen.

2.3. Morphologische Untersuchung von sas-1

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten des Mycels von sas-1 (Abb.7) zeigen die wesentlichen morphologischen Merkmale des Schimmelpilzes Neurospora crassa. Die schlauchförmigen Zellen bilden septierte Hyphen und sind von einer starken Zellwand umgeben.

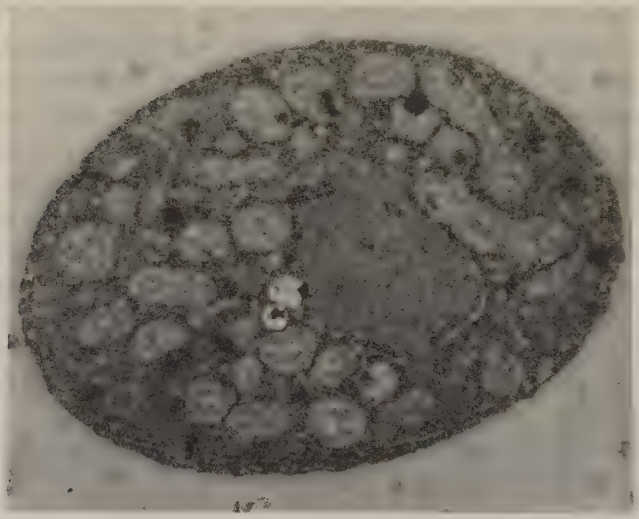


Abb.7: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch das Mycel von sas-1 (Vergr. 12ooofach).

Das Cytoplasma enthält die typischen Bestandteile einer eukaryoten Zelle (vergl. Abb.7). Auffällig sind nur häufig auftretende Vakuolen und ein schwach ausgeprägtes endoplasmatisches Reticulum. Im Vergleich mit dem Wildtyp erscheint die Stärke der Zellwand reduziert. Andere morphologische Unterschiede zum Wildtyp, speziell was Größe, Anzahl und Struktur der Mitochondrien betrifft, sind nicht sichtbar.

Um den Befund der weniger dicken Zellwand auch biochemisch zu erhärten, wurde das Biuret-positive Protein aus Myce-

lien der Mutante und des Wildtyps extrahiert. Da die Zellwand überwiegend aus nicht proteinhaltigen Bestandteilen (Cellulose, Chitin, Polygalaktosamin (16)) aufgebaut ist, kann bei der Mutante ein höherer spezifischer Proteingehalt der Zelle erwartet werden. Als Bezugspunkt wurde das Trockengewicht des Mycels gewählt.

Die Bestimmung des Biuret-positiven Proteins ergab bei

sas-1 351 µg/mg Trockengewicht und bei

Wildtyp 223 µg/mg Trockengewicht.

Der um ungefähr 1,6mal höhere spezifische Proteingehalt in sas-1-Zellen paßt zu dem elektronenmikroskopischen Befund.

2.4. Biochemische Untersuchungen an sas-1

2.4.1. Wachstum der Mutante

Die Abb.8 zeigt eine Wachstumskurve einer bei 25°C gewachsenen Kultur. Das Wachstum des Mycels läßt sich an Hand der Kurve grob in drei Phasen einteilen:

Phase A: zunehmende Wachstumsrate

Phase B: konstante Wachstumsrate mit exponentiellem Wachstum ("Log-Phase")

Phase C: abnehmende Wachstumsrate und Übergang zur Stationären Phase

Die Verdoppelungszeit des Mycelgewichtes betrug in der Log-Phase (Phase B) ungefähr 6 Stunden.

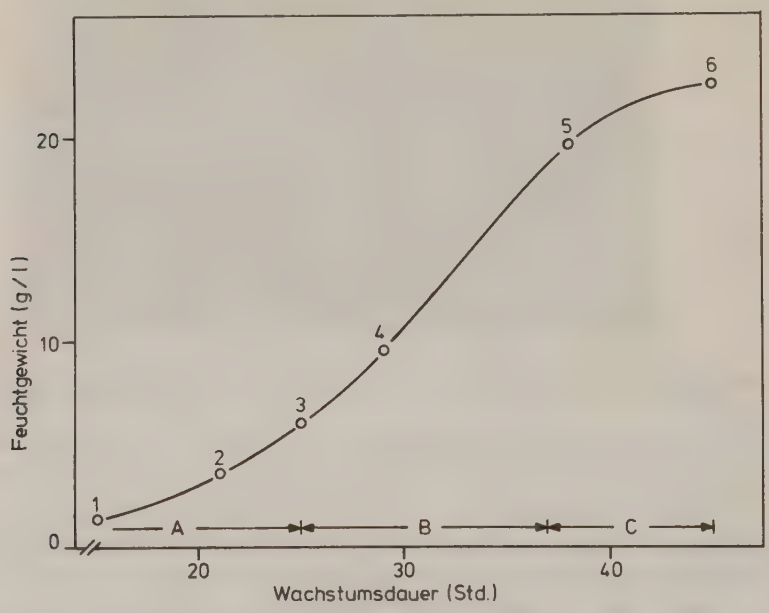


Abb.8: Wachstumskurve von sas-1 bei 25°C. Die Kultur wurde mit $1{,}0 \cdot 10^6$ Konidien/ml Zuchtmedium inoculiert.

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben (in Abb.8 durch 1 , 2 etc. gekennzeichnet) aus der Kultur entnommen

und das Feuchtgewicht des Mycels durch Wiegen bestimmt. Ein kleiner Teil des Mycels diente zur Messung des Sauerstoffverbrauchs der Zellen; aus dem übrigen Teil des Mycels wurden Mitochondrien präpariert und deren Cytochromspektren aufgenommen.

2.4.2. Messung des Sauerstoffverbrauchs von ganzen Zellen

Der Sauerstoffverbrauch der Zellen wurde mit einer modifizierten Sauerstoffelektrode nach Clark (siehe Experimenteller Teil) bestimmt.
Die Meßergebnisse, die mit dem Mycel aus den einzelnen Proben mit der Sauerstoffelektrode erhalten wurden, sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. $\Delta(O_2)$ gibt die Abnahme der Sauerstoffkonzentration in der Reaktionslösung an; als Bezugspunkt diente das Trockengewicht des im Reaktionsgefäß der Elektrode befindlichen Mycels.

Tabelle 1: Sauerstoffverbrauch der Zellen aus den einzelnen Proben (siehe Wachstumskurve Abb.8)

Probennummer	1	2	3	4	5	6
$\Delta(O_2)$ $\left[\mu M\ \frac{1}{2} O_2 / min \cdot mg\right]$	319	354	155	212	164	89
$\Delta(O_2)$ nach KCN-Zugabe	319	354	155	212	123	71
% $CN^{\ominus}$-sensitive Atmung	0	0	0	0	25	20

In Abb.9 sind Messungen des Sauerstoffverbrauchs von sas-1- und Wildtyp-Zellen und dessen Beeinflussung durch Cyanid (KCN) und Salicylhydroxamat (SHAM) mit der Sauerstoffelektrode gezeigt. Beide Mycelien wurden in der Mitte der Log-Phase geerntet und die Versuche mit den intakten Zellen sofort durchgeführt.
Der Zusatz von KCN zur Reaktionslösung hatte keinen meßbaren Einfluß auf den Sauerstoffverbrauch der sas-1-Zellen, während die Atmung der Wildtyp-Zellen durch KCN vollständig gehemmt wurde. Umgekehrt ließ sich der Sauerstoffverbrauch von Wildtyp-Zellen durch Zugabe von SHAM nicht meßbar beeinflussen, während die Atmung von sas-1-Zellen fast vollständig gehemmt wurde. Das verzögerte Einsetzen der Hemmung des Sauerstoffverbrauchs der sas-1-Zellen

durch SHAM ist wahrscheinlich auf den unter diesen Bedingungen langsamen Transport des Moleküls in die Mitochondrien zurückzuführen. Zum Zeitpunkt der vollständig gehemmten Atmung befanden sich die Zellen noch in einem aeroben Milieu.

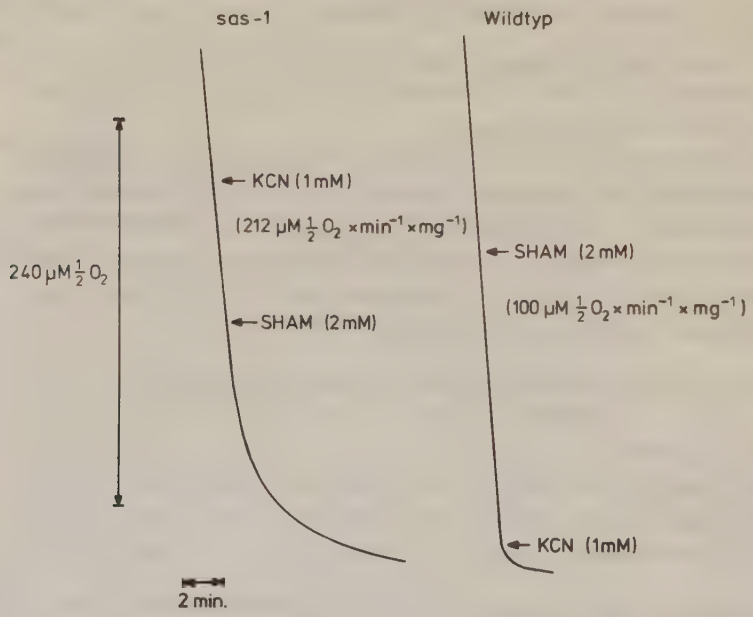


Abb.9: Messungen des Sauerstoffverbrauchs von sas-1- und Wildtyp-Zellen aus bei 25°C gewachsenen Kulturen. Die Versuche wurden bei 25°C mit Saccharose-Minimalmedium als Reaktionslösung durchgeführt. Die Abnahme der Sauerstoffkonzentration in der Reaktionslösung ist in Klammern angegeben. Die Pfeile kennzeichnen die Zugabe von SHAM (2 mM) oder KCN (1 mM).

In den Proben 5 und 6 , die beim Übergang in die Stationäre Phase entnommen wurden, läßt sich allerdings trotz fehlender Absorption der Mitochondrien bei 605 nm (α-Bande von red. Cytochrom aa_3, siehe nächster Abschnitt) ein $CN^{\ominus}$-sensitiver Anteil des Sauerstoffverbrauchs von etwa 20% (Tabelle 1), bezogen auf die unbeeinflußte Atmung, nachweisen.

2.4.3. Cytochromgehalt von sas-1-Mitochondrien

Die Differenz-Absorptionsspektren (reduziert minus oxidiert) von sas-1-Mitochondrien wurden bei Raumtemperatur aufgenommen. In Abb.10 ist ein solches Spektrum von Mitochondrien (aus Probe 3) dargestellt. Weder Cytochrom aa_3 (605 nm bzw. 442 nm) noch b-Typ-Cytochrome (559 nm bzw. 428 nm) konnten mit dieser Technik nachgewiesen werden. Die hohen Absorptionsmaxima bei 550 nm, 520 nm und 420 nm entsprechen der α-, β- und γ-Bande von reduziertem Cytochrom $c+c_1$. Der Gehalt an Cytochrom $c+c_1$ betrug 1,3 nmol/mg Protein; ein ähnlicher Wert wurde bei Wildtyp-Mitochondrien gefunden (17).

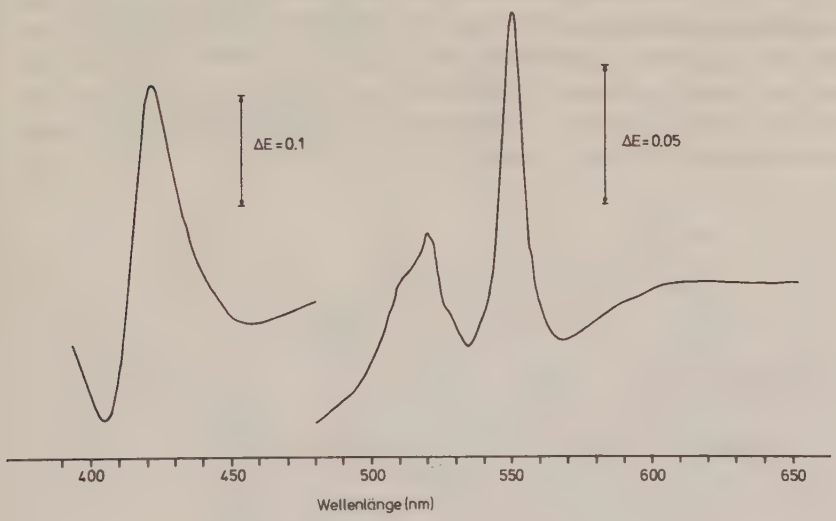


Abb.10: Differenzspektrum von sas-1-Mitochondrien bei Raumtemperatur. Der Inhalt der Meßküvette wurde mit Dithionit reduziert, derjenige der Vergleichsküvette mit Ferricyanid oxidiert. Die Proteinkonzentration der Mitochondriensuspension war 4,0 mg/ml.

Die aus den Spektren berechneten Cytochromgehalte der Mitochondrien aus den einzelnen Proben der Kultur sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Cytochromgehalt der Mitochondrien aus den einzelnen Proben (siehe Wachstumskurve Abb.8). Aus Probe 1 konnten nicht genügend Mitochondrien für ein Spektrum gewonnen werden.

Probennummer		2	3	4	5	6
Cytochromgehalt	Cyt.aa_3		nicht nachweisbar			
$\left[\frac{\text{nmol Cytochrom}}{\text{mg Protein}}\right]$	Cyt.b		nicht nachweisbar			
	Cyt.$c+c_1$	0,8	1,32	1,18	0,9	0,8

Der Gehalt an Cytochrom $c+c_1$ ist von der Wachstumsphase abhängig; er erreicht in der frühen Log-Phase ein Maximum (siehe Tabelle 2) und nimmt im weiteren Verlauf des Wachstums kontinuierlich ab.

Um das Cytochromspektrum noch genauer aufzulösen, wurden submitochondriale Partikel aus Mitochondrien präpariert und deren Differenzspektrum als Tieftemperaturspektrum bei ca. -190°C, Abb.11, aufgenommen. Es ist jetzt deutlich zu sehen, daß sas-1 Cytochrom c_1 (552 nm) enthält. Überraschenderweise ist auch ein Cytochrom vom b-Typ

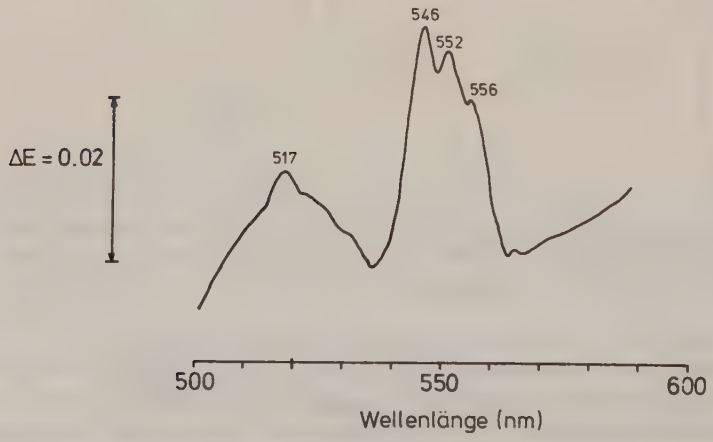


Abb.11: Tieftemperatur-Differenzspektrum submitochondrialer Partikel. Beide Küvetten standen in flüssigem Stickstoff. Die Partikelsuspension enthielt 0,5 M Saccharose; der Inhalt der Meßküvette wurde mit Dithionit reduziert, derjenige der Vergleichsküvette blieb luftoxidiert.

(556 nm) nachzuweisen. Die beim Wildtyp sichtbare Absorptionslinie bei 562 nm (zweites b-Typ-Cytochrom) fehlt bei der Mutante. Die Absorptionslinie bei 546 nm (17) ist durch nicht vollständig entferntes Cytochrom c verursacht und diente zur Eichung der Wellenlängenskala. Auf eine quantitative Auswertung des Spektrums wurde verzichtet.

2.4.4. Enzymaktivitäten in sas-1-Mitochondrien

2.4.4.1. Enzymatische Aktivität der Cytochromoxidase

Trotz fehlender $CN^{\ominus}$-sensitiver Atmung (Abb.9) und keiner Absorption bei 605 nm (Abb.10) läßt sich in Mitochondrien von sas-1 eine geringe Enzymaktivität nachweisen. Die spezifische Aktivität wurde aus den in Abb.12 dargestellten Kinetiken für Wildtyp und sas-1 berechnet. Beim Wildtyp ergab sich ein Wert von 1,9 U/mg Protein, bei sas-1 0,13 U/mg Protein; das entspricht etwa 7% der spezifischen Aktivität vom Wildtyp.

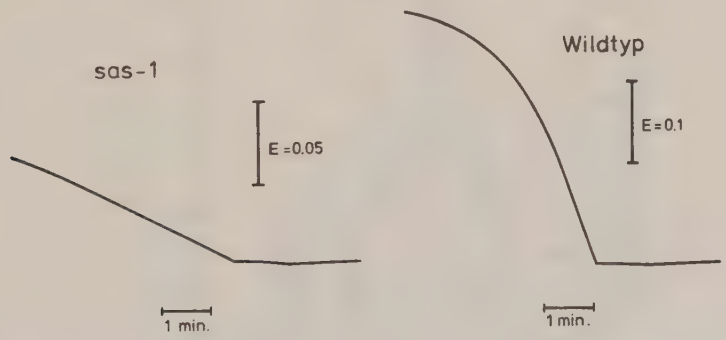


Abb.12: Messung der enzymatischen Aktivität von Cytochromoxidase in sas-1 und Wildtyp bei 25°C. Der Start der Reaktion durch Zugabe von Mitochondrien ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Proteinkonzentration der Mitochondriensuspension von sas-1 betrug 5 µg/ml, diejenige vom Wildtyp 4,6 µg/ml.

2.4.4.2. Enzymatische Aktivität der ATP-ase

In sas-1-Mitochondrien ist eine ATP-ase-Aktivität vorhanden. Die spezifische Aktivität betrug bei sas-1 2,2 U/mg, beim Wildtyp 2,9 U/mg Protein. Wie beim Wildtyp ist auch bei sas-1 die ATP-ase durch niedrige Konzentrationen von Oligomycin (10 µg/ml) hemmbar. Nach Oligomycin-Zugabe wurden bei sas-1 0,62 U/mg Protein (28% der ungehemmten Aktivität) und beim Wildtyp 0,38 U/mg Protein (13% der ungehemmten Aktivität) gemessen.

2.4.5. Elektrophoretische Auftrennung der gesamten mitochondrialen Membranproteine

Die gesamten Zellproteine einer Kultur wurden durch dreistündigen Einbau von ^{14}C-Leucin homogen markiert. Die gel-

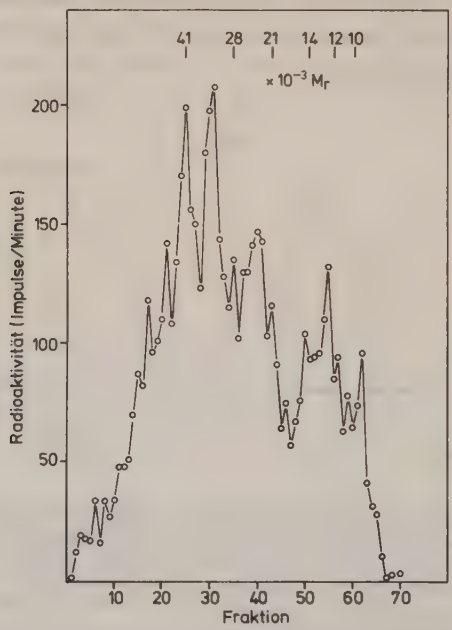


Abb.13: Gelelektrophoretische Auftrennung der mitochondrialen Membranproteine. Nach der Präparation mitochondrialer Membranen wurden deren Proteine durch eine SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Eichung des Gels erfolgte mit Untereinheiten der Cytochromoxidase vom Wildtyp.

elektrophoretische Auftrennung aller mitochondrialen Membranproteine ist in Abb.13 dargestellt. Eine große Anzahl (etwa 25) von Proteinen (scheinb. Molekulargew. 70ooo bis 10ooo) ließ sich auftrennen. Das Ergebnis entspricht dem Verteilungsmuster wie es auch beim Wildtyp erhalten wird (18).

2.4.6. Mitochondriale Translationsprodukte

Die mitochondrialen Proteine einer Zellkultur wurden in Gegenwart von Cycloheximid mit ^{3}H-Leucin markiert. In Abb.14 ist das Cycloheximid-resistente Einbaumuster der

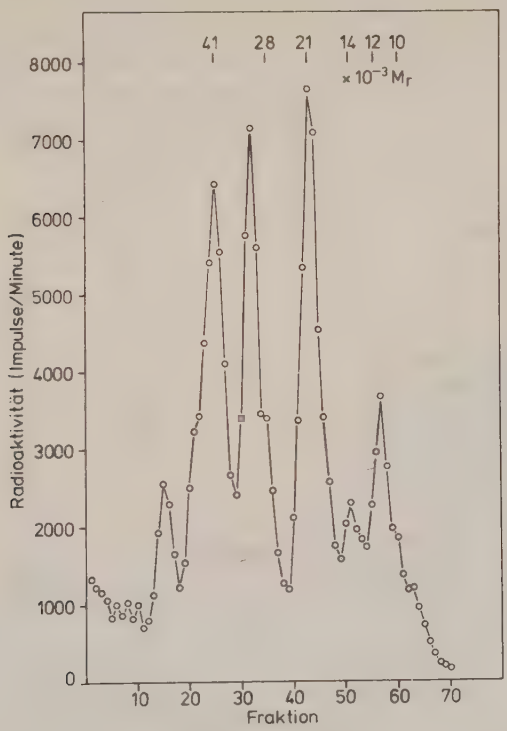


Abb.14: Gelelektrophoretische Auftrennung mitochondrialer Translationsprodukte von sas-1. Nach der Präparation mitochondrialer Membranen wurden deren Proteine durch eine SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

mitochondrialen Membranen von sas-1 dargestellt. Sowohl hoch- als auch niedermolekulare Polypeptide sind vorhanden; verglichen mit Wildtyp-Membranen ist die Synthese der hochmolekularen Polypeptide jedoch eingeschränkt.

2.4.7. Untereinheiten von Cytochromoxidase und Häm a -Gehalt

2.4.7.1. Polypeptid-Untereinheiten

Mit einer immunologischen Methode wurde untersucht, ob sas-1 Polypeptid-Untereinheiten von Cytochromoxidase enthält. Dabei wurden Mitochondrien mit einem Antiserum gegen gesamte Cytochromoxidase behandelt. In Abb.15 ist die gelelektrophoretische Analyse eines Immunpräzipitats dargestellt (Details siehe Legende und Experimenteller Teil).

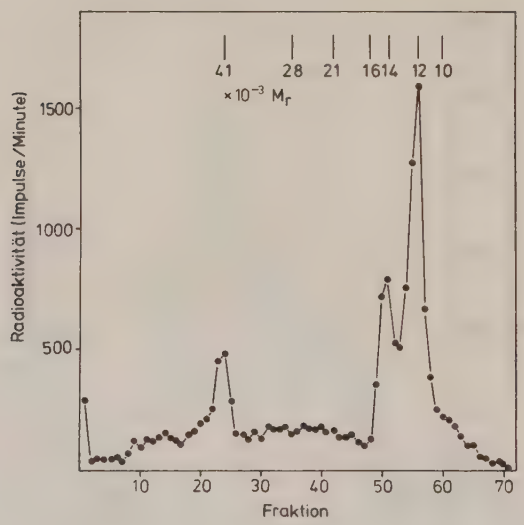


Abb.15: Gelelektrophorese der Untereinheiten von Cytochromoxidase in sas-1. Das Zellprotein wurde homogen mit ^{3}H-Leucin markiert. Die aus diesen Zellen gewonnenen Mitochondrien wurden mit nicht markierten Wildtyp-Mitochondrien gemischt, in Triton X-100 solubilisiert und mit einem Antikörper gegen gesamte Cytochromoxidase versetzt. Das Immunpräzipitat wurde durch eine SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Eichung des Gels erfolgte mit Untereinheiten der Cytochromoxidase vom Wildtyp.

Die an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisierten Untereinheiten 5, 6 und 7 (scheinbare Molekulargewichte 14000, 12000 und 10000) sind vorhanden; Untereinheit 4 (scheinb. Molekulargew. 16000) kann hier nicht eindeutig nachgewiesen werden.
Von den an mitochondrialen Ribosomen gebildeten Untereinheiten kann nur Untereinheit 1 (scheinb. Molekulargewicht 41000) eindeutig identifiziert werden.

Um über die Untereinheiten 2 und 3 (scheinb. Molekulargew. 28000 und 21000) weiteren Aufschluß zu erhalten, wurde die cytoplasmatische Proteinsynthese spezifisch gehemmt. Dadurch wird ein empfindlicher Nachweis der mitochondrial gebildeten Untereinheiten ermöglicht. Die Abb.16 zeigt die gelelektrophoretische Analyse des Immunpräzipitats der mitochondrial synthetisierten Untereinheiten.

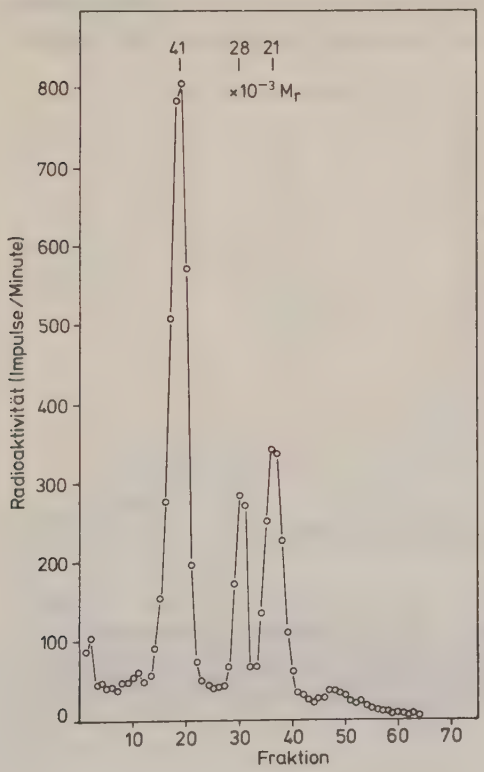


Abb.16: Gelelektrophorese der mitochondrial synthetisierten Untereinheiten von Cytochromoxidase in sas-1.
Die mitochondrialen Proteine wurden in Gegenwart von Cycloheximid mit ^{3}H-Leucin markiert. Nach Isolierung der Mitochondrien wurde eine Immunpräzipitation wie in der Legende zu Abb.15 beschrieben durchgeführt.

Neben Untereinheit 1 sind jetzt auch die Untereinheiten 2 und 3 eindeutig nachzuweisen, d.h. alle drei an mitochondrialen Ribosomen gebildeten Untereinheiten sind in sas-1, wenn auch in anderen Relationen wie im Wildtyp, vorhanden.

2.4.7.2. Häm a -Gehalt in sas-1-Mitochondrien

Nachdem in sas-1 Polypeptid-Untereinheiten von Cytochromoxidase gebildet werden, wurde untersucht, ob in den Mitochondrien auch Häm a vorhanden ist. Im Gegensatz zum Wildtyp, der etwa 0,5 nmol Häm a /mg Mitochondrienprotein enthält (9), konnten aus sas-1-Mitochondrien nur 0,03 nmol Häm a /mg Mitochondrienprotein extrahiert werden; das entspricht ungefähr 6% des Häm a -Gehaltes des Wildtyps. Die Abb.17 A und B zeigen die Spektren der Pyridinhämochromogene vom Wildtyp und von sas-1. Die Absorptionsmaxima bei 587 nm und 557 nm entsprechen Häm a (587 nm) und Protohäm (557 nm).

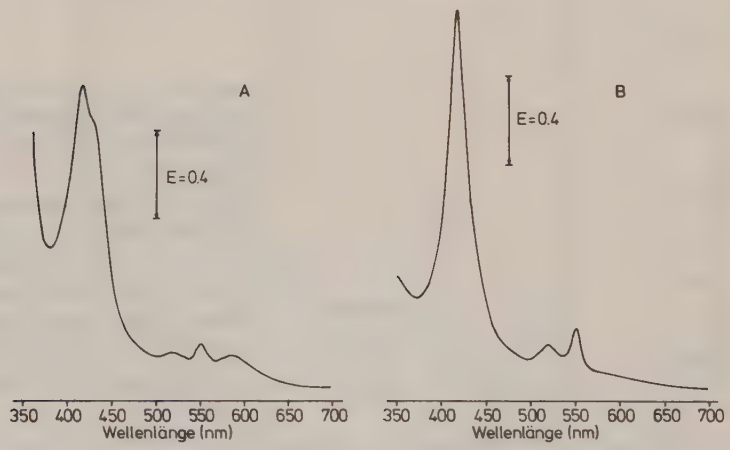


Abb.17: Absolutspektren der Pyridinhämochromogene vom Wildtyp (Abb.17 A) und von sas-1 (Abb.17 B). Die Hämine wurden aus Mitochondrien extrahiert (siehe Experimenteller Teil), in Pyridin-Wasser aufgenommen und mit Dithionit reduziert.

2.4.8. RNA-Gehalt der Mitochondrien und mitochondriale Ribosomen

2.4.8.1. RNA-Gehalt von sas-1-Mitochondrien

Der RNA-Gehalt von sas-1-Mitochondrien zeigt keinen Unterschied zu dem von Wildtyp-Mitochondrien. Für sas-1 wurden 50 µg RNA/mg und für Wildtyp 47 µg RNA/mg Mitochondrienprotein bestimmt.

2.4.8.2. Ribosomen und ribosomale Untereinheiten

In Abb.18 ist ein Saccharose-Dichtegradientenprofil mitochondrialer Ribosomen von sas-1 dargestellt. Kleine und große Untereinheit (M_S, M_L), sowie Monosomen- (M_M) und Polysomenfraktion (Di-, Tri- und Tetrasomen) sind gut zu erkennen. Die relativen Anteile der einzelnen Ribosomenfraktionen der Mutante unterscheiden sich nicht wesentlich von denen des Wildtyps.

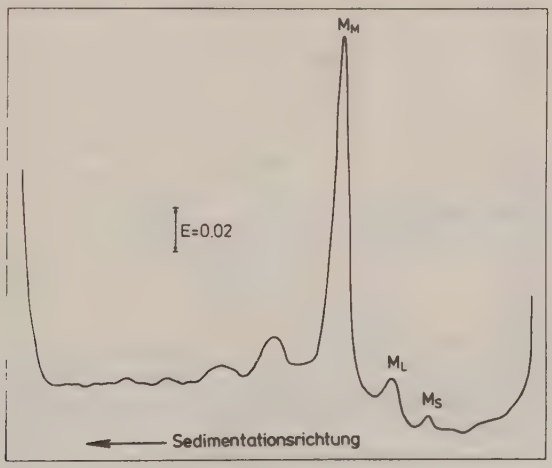


Abb.18: Dichtegradientenprofil mitochondrialer Ribosomen von sas-1. Zur Präparation der Ribosomen siehe Experimenteller Teil. Die Ribosomenfraktion (entsprechend 30 µg RNA) wurde auf einen Saccharose-Dichtegradienten (10%-34% Saccharose) aufgetragen und für 2 Stunden bei 40ooo Upm zentrifugiert.

Durch eine separate Analyse der ribosomalen Untereinheiten wurde untersucht, ob das Verhältnis kleiner zu großer Untereinheit im Vergleich mit dem des Wildtyps verändert ist. Wie das Dichtegradientenprofil der dissoziierten mitochondrialen Ribosomen in Abb.19 zeigt, besteht auch hierin kein wesentlicher Unterschied zum Wildtyp. Bei sas-1 (Abb.19 A) ist das Verhältnis 1:1,8 , beim Wildtyp 1:2 (Abb.19 B).

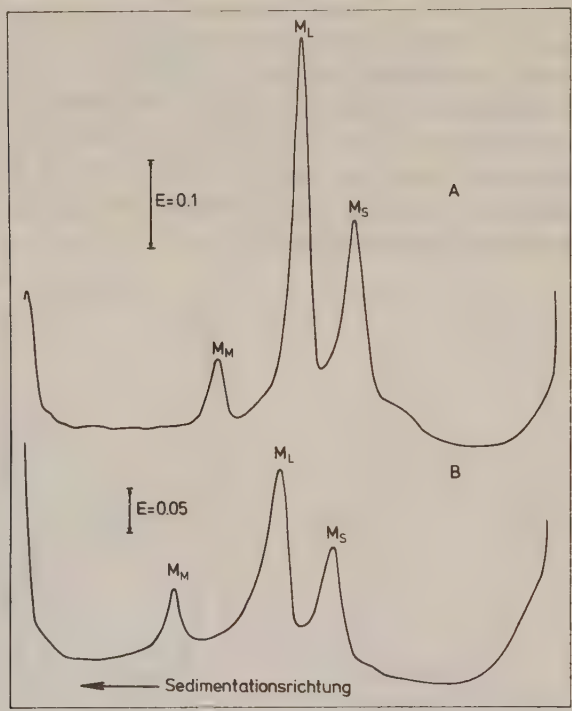


Abb.19: Dichtegradientenprofil mitochondrialer ribosomaler Untereinheiten von sas-1 (Abb.19 A) und Wildtyp (Abb.19 B). Zur Präparation der Untereinheiten aus Ribosomen siehe Experimenteller Teil. Auf die Saccharose-Dichtegradienten (10%-27% Saccharose) wurden dissoziierte Ribosomen (entsprechend 48 µg RNA -sas-1- bzw. 52 µg RNA -Wildtyp-) aufgetragen und 4 Stunden bei 40ooo Upm zentrifugiert.

2.4.9. Einfluß der Wachstumstemperatur auf die $CN^{\ominus}$-insensitive Atmung und den Cytochromgehalt

Um festzustellen, welchen Einfluß verschiedene Temperaturen auf das Wachstum, die $CN^{\ominus}$-insensitive Atmung und den Cytochromgehalt der Mutante ausüben, wurden bei 12°C und bei 37°C gewachsene Kulturen untersucht. Das Aufarbeiten der Proben erfolgte wie in 2.4.1. für das Wachstum bei 25°C beschrieben.

2.4.9.1. Wachstum bei 12°C

In Abb.20 ist die Wachstumskurve einer bei 12°C gewachsenen Kultur dargestellt. Die Verdoppelungszeit des Mycelgewichtes betrug in der Log-Phase etwa 19 Stunden.

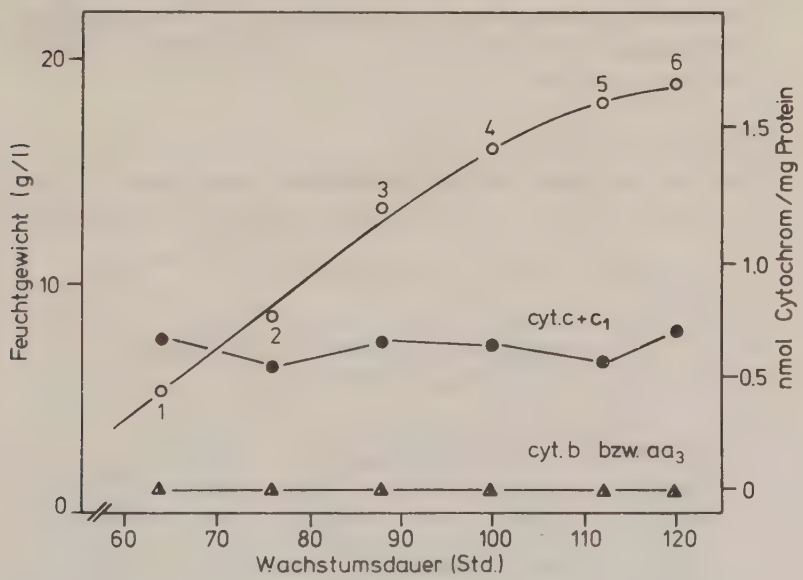


Abb.20: Wachstumskurve von sas-1 bei 12°C. Die Kultur wurde mit $2{,}0 \cdot 10^6$ Konidien/ml Zuchtmedium inoculiert.

Der Sauerstoffverbrauch des Mycels aus den einzelnen Proben ist in Tabelle 3 wieder als Abnahme der Sauerstoffkonzentration $-\Delta(O_2)$- in der Reaktionslösung angegeben.

Tabelle 3: Sauerstoffverbrauch der Zellen aus den einzelnen Proben (siehe Wachstumskurve Abb.20)

Probennummer	1	2	3	4	5	6
$\Delta(O_2)$ $[\mu M\ \frac{1}{2} O_2 / min \cdot mg]$	236	304	106	115	160	152
$\Delta(O_2)$ nach KCN-Zugabe	236	304	106	115	160	152
% $CN^{\ominus}$-sensitive Atmung	0	0	0	0	0	0

Aus der Tabelle ist zu entnehmen, daß mit der Sauerstoffelektrode in keiner Wachstumsphase ein $CN^{\ominus}$-sensitiver Anteil an der Atmung nachweisbar ist.

Die Absorptionsspektren der Mitochondrien unterschieden sich qualitativ nicht von denen, die aus den Proben der 25°C-Kultur erhalten wurden.
Der in Abb.20 gleichzeitig eingetragene Gehalt an Cytochrom $c+c_1$ zeigt nicht mehr den von der Wachstumsphase abhängigen Verlauf wie er bei der 25°C-Kultur zu sehen ist (Tabelle 2).

2.4.9.2. Wachstum bei 37°C

Die Abb.21 zeigt die Wachstumskurve einer bei 37°C gewachsenen Kultur. Die Verdoppelungszeit des Mycelgewich-

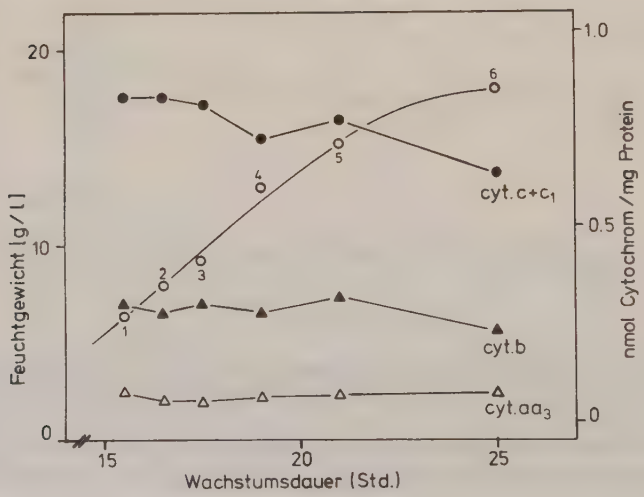


Abb.21: Wachstumskurve von sas-1 bei 37°C. Die Kultur wurde mit $1{,}0 \cdot 10^6$ Konidien/ml Zuchtmedium inoculiert.

tes betrug in der Log-Phase etwa 3,5 Stunden.

Der Sauerstoffverbrauch des Mycels aus den einzelnen Proben ist in Tabelle 4 als $\Delta(O_2)$ angegeben.

Tabelle 4: Sauerstoffverbrauch der Zellen aus den einzelnen Proben (siehe Wachstumskurve Abb.21)

Probennummer	1	2	3	4	5	6
$\Delta(O_2)$ $[\mu M \frac{1}{2} O_2 / min \cdot mg]$	44,5	66,5	58,0	54,5	53,2	35,8
$\Delta(O_2)$ nach KCN-Zugabe	22,2	26,6	20,7	21,8	22,6	14,3
% $CN^{\ominus}$-sensitive Atmung	50	60	64	60	58	60

Bei den Messungen des Sauerstoffverbrauchs, die unter denselben Bedingungen wie in der Legende zu Abb.9 angegeben durchgeführt wurden, zeigte die Mutante ein anderes Verhalten (Abb.22): Die Zugabe von KCN bewirkte in <u>allen</u> Wachstumsphasen eine deutliche Abnahme des Sauerstoff-

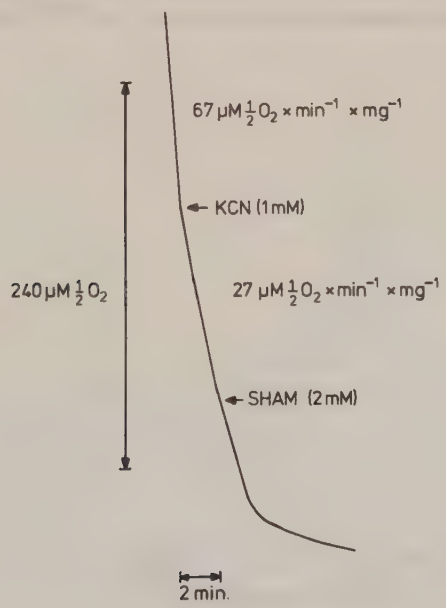


Abb.22: Messung des Sauerstoffverbrauchs von sas-1-Zellen aus einer bei 37°C gewachsenen Kultur. Zur Versuchsdurchführung siehe Legende zu Abb.9 .

verbrauchs der Zellen; der $CN^{\ominus}$-sensitive Anteil der Atmung schwankte zwischen 50% und 64% (Tabelle 4) der unbeeinflußten Atmung. Nach Zusatz von SHAM war auch hier die restliche Atmung gehemmt.

Bei der Aufnahme der Absorptionsspektren der Mitochondrien ergab sich ebenfalls ein anderes Resultat: Neben Cytochrom $c+c_1$ sind auch Cytochrom b und Cytochrom aa_3 nachweisbar (Abb.21 und Abb.23).
Das Differenzspektrum der Mitochondrien (Abb.23) unterscheidet sich deutlich von dem in Abb.10 dargestellten; in dem Spektrum von Abb.23 ist zusätzlich sowohl bei 605 nm (Cytochrom aa_3) als auch, als Schulter ausgeprägt, bei 559 nm (Cytochrom vom b-Typ) ein deutliches Absorptionsmaximum zu sehen.
Der Gehalt an Cytochrom $c+c_1$ (Cytochromgehalte in den einzelnen Proben siehe Abb.21) ist in ähnlicher Weise von der Wachstumsphase abhängig wie bei der bei 25°C gewach-

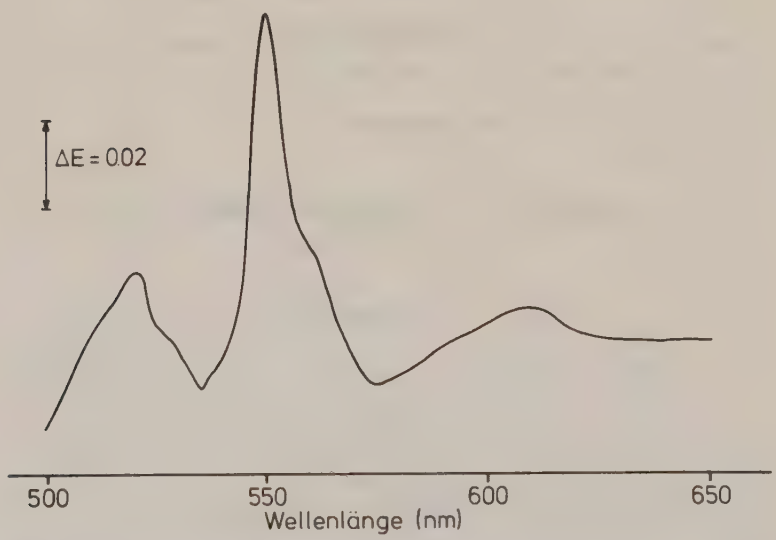


Abb.23: Differenzspektrum von sas-1-Mitochondrien bei Raumtemperatur. Die Proteinkonzentration der Mitochondriensuspension war 4,8 mg/ml. Weitere Angaben wie in der Legende zu Abb.10 .

senen Kultur (Tabelle 2). Der Gehalt an Cytochrom aa_3 bzw. Cytochrom b ist von der Wachstumsphase unabhängig.

Nach Wachstum bei höherer Temperatur (37°C) sind folgende Unterschiede zu bei 25°C bzw. 12°C gewachsenen Kulturen zu beobachten:

- $CN^{\ominus}$-sensitiver Anteil der Atmung zwischen 50% und 64%,
- Gehalt an Cytochrom aa_3 etwa 27%, Gehalt an Cytochrom b etwa 50% desjenigen vom Wildtyp.

3. DISKUSSION

3.1. Mutagenese und Selektion

Mutagenese: Bei Mutagenen müssen nach ihrem Wirkungsprinzip zwei Gruppen unterschieden werden:

1) Stoffe, die Veränderungen an bereits in DNS eingebauten Basen bewirken und somit an nicht in Replikation befindlicher DNS angreifen (z.B. alkylierende Agentien, salpetrige Säure, UV-Licht),
2) Basenanaloge, die als Bausteine in sich teilende DNS eingebaut werden müssen.

Eine Mutagenese mit Basenanalogen, wie hier beschrieben, kann deshalb nicht an Konidien sondern nur an Zellen, in denen eine Replikation der DNS abläuft, durchgeführt werden. Bei der Replikation besteht dann die Möglichkeit, daß die angebotene "falsche" Base (das Mutagen) in die sich duplizierende DNS eingebaut wird.

Da eine eukaryote Zelle etwa 100mal mehr DNS im Kern als in den Mitochondrien enthält, muß zur Induktion cytoplasmatischer Mutanten die Replikation der nukleären DNS weitgehend eingeschränkt werden, während die der mitochondrialen DNS möglichst uneingeschränkt weiter ablaufen sollte. Dadurch wird die Chance, daß das Basenanalog bei der Synthese mitochondrialer DNS mitverwendet wird, wesentlich größer.

Cycloheximid ist ein Antibiotikum, das die cytoplasmatische Proteinsynthese selektiv reversibel hemmt, indem es sich mit der großen Untereinheit cytoplasmatischer Ribosomen verbindet und die Entstehung der Peptidbindung verhindert (19). Man muß weiter annehmen, daß als Folge der gehemmten Proteinsynthese nach einer gewissen Zeit auch die Replikation der nukleären DNS eingeschränkt wird oder ganz zum Erliegen kommt. Für Hefe (Saccharomyces cerevisiae) ist eine direkte reversible Hemmung der nukleären DNS-Synthese durch Cycloheximid beschrieben, während die mitochondriale DNS-Synthese unbeeinflußt bleiben soll (15). Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß sich mit dieser

Methode auch bei Neurospora crassa selektiv Mutationen im mitochondrialen Genom induzieren lassen.

Selektion: Mitochondrien von Neurospora crassa verfügen neben der "klassischen" Atmungskette über eine zweite Sauerstoff-bindende Endoxidase ("alternative oxidase"). Der Weg über dieses Enzymsystem, über das noch sehr wenig bekannt ist (20), zweigt beim Ubichinon von der Atmungskette ab.

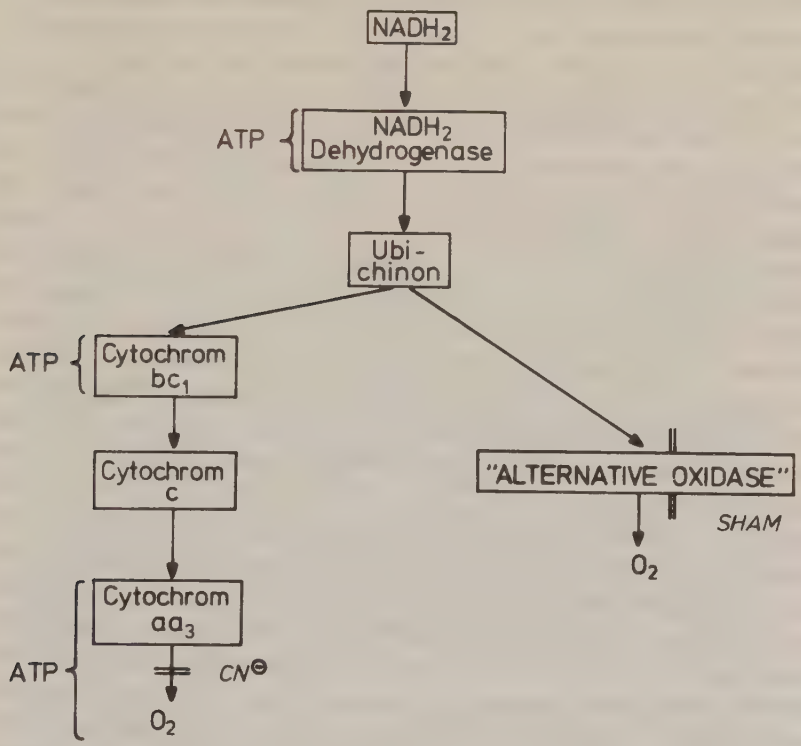


Abb.24: Schematische Darstellung der verzweigten Atmungskette bei Neurospora crassa.

Wie aus der schematischen Darstellung der verzweigten Atmungskette (Abb.24) hervorgeht, ist bei einer Übertragung der Elektronen durch die "alternative oxidase" auf

Sauerstoff keine weitere ATP-Synthese mehr möglich; pro Mol $NADH_2$ kann also nur noch 1 Mol ATP gewonnen und der Wasserstoff, der über Flavoproteine beim Ubichinon eingespeist wird, nicht mehr zur Energiegewinnung ausgenützt werden.
Aus dem Schema ist weiter zu entnehmen, daß die Elektronenübertragung durch die "alternative oxidase" durch Salicylhydroxamat (SHAM) hemmbar ist.
Zur Selektion der Mutante wurden die Existenz der verzweigten Atmungskette und deren Eigenschaften ausgenützt. Werden Zellen nach der Mutagenese in Acetat-Minimalmedium inkubiert, so können sich nur diejenigen weiter teilen und Hyphen bilden, die selbst mit Acetat als Kohlenstoffquelle noch genügend Energie für den Bau- und Betriebsstoffwechsel gewinnen können und deshalb über eine intakte Atmungskette mit funktionierender Oxidativer Phosphorylierung verfügen müssen.
Eine kurze Bilanz soll dies veranschaulichen: Beim vollständigen Abbau von 1 Mol Glucose werden 38 Mol ATP gewonnen, beim vollständigen Abbau von 1 Mol Acetat im Krebszyklus 12 Mol ATP. Kann Acetat wegen eines Defektes in der Atmungskette nach dem Ubichinon nur noch über die "alternative oxidase" abgebaut werden, so können pro Mol nur 4 Mol ATP gewonnen werden. Die Energieausbeute beträgt also nur noch 33%.
Bei der Inkubation in Acetat-Minimalmedium werden aber auch alle diejenigen Zellen mitselektiert, die Acetat auf Grund anderer genetischer Defekte (z.B. fehlende Aufnahme und Transport des Metaboliten) nicht zur Energiegewinnung ausnützen können. Deshalb wurde die Zellsuspension zu Saccharose-Minimalmedium in Gegenwart von Salicylhydroxamat gegeben. Weitere Zellteilungen bei der Inkubation in diesem Medium setzen wegen der durch Salicylhydroxamat gehemmten "alternative oxidase" ebenfalls den "klassischen Zweig" der Atmungskette (mit Cytochromoxidase als Sauerstoff-bindendem Enzym) voraus.
Zellen, die wegen eines genetischen Defektes keine funktionsfähige Cytochromoxidase mehr haben, sind zur Energie-

gewinnung unbedingt auf die "alternative oxidase" angewiesen. Weder mit Acetat als Kohlenstoffquelle noch mit durch Salicylhydroxamat gehemmter "alternative oxidase" können sich solche Zellen weiter teilen und Hyphen bilden. Deshalb ist diese Methode, die auf einer möglichst selektiven Wachstumshemmung beruht, zur Selektion der gesuchten (Cytochromoxidase-deficienten) Zellen geeignet.

3.2. Vergleich der untersuchten Eigenschaften von sas-1 mit den Cytochromoxidase-deficienten Mutanten mi-1 und cni-1

Die beschriebene Mutante (sas-1) wird im folgenden mit einer nukleären (cni-1) und einer cytoplasmatischen Mutante (mi-1) verglichen.
Phänotypisch bestehen zwischen den drei Mutanten zunächst keine Unterschiede; die Differenzspektren der Mitochondrien aus den Mutanten sind qualitativ nahezu identisch (9). In der späten Log-Phase von bei 25°C gewachsenen Kulturen unterscheidet sich jedoch sas-1 deutlich von mi-1 und cni-1. Sowohl mi-1 als auch cni-1 bilden in dieser Wachstumsphase enzymatisch aktive Cytochromoxidase (9), die sich auch spektroskopisch einwandfrei nachweisen läßt. Bei sas-1 konnte <u>spektroskopisch</u> in <u>keiner</u> Wachstumsphase Cytochromoxidase nachgewiesen werden.
Ob der beim Übergang in die Stationäre Phase beobachtete $CN^{\ominus}$-sensitive Anteil des Sauerstoffverbrauchs (20% bis 25%) durch eine geringe Menge gerade induzierter aber hochaktiver Cytochromoxidase oder durch ein anderes $CN^{\ominus}$-sensibles Sauerstoff-bindendes Enzym verursacht ist, muß offenbleiben.
Ebensowenig läßt sich mit der Enzymaktivität, durch die reduziertes Cytochrom c verbraucht wird und die immerhin 7% derjenigen des Wildtyps beträgt, eindeutig Cytochromoxidase in Verbindung bringen, da neben dem fehlenden spektroskopischen Nachweis auch keine $CN^{\ominus}$-sensitive Atmung feststellbar ist.

Was die mitochondrialen Translationsprodukte betrifft, so ist bei sas-1 wie bei mi-1 die Fraktion mit dem scheinbaren Molekulargewicht 21ooo viel stärker als beim Wildtyp ausgeprägt. Das steht im Gegensatz zu cni-1, wo diese und alle höhermolekularen Fraktionen fehlen (9). Die Synthese der höhermolekularen Polypeptide (scheinbare Molekulargewichte >21ooo) ist bei sas-1 wie bei mi-1, verglichen mit dem Wildtyp, reduziert.
Beim Vergleich der drei Mutanten bezüglich der Polypeptid-Untereinheiten der Cytochromoxidase fällt die große Ähnlichkeit zwischen sas-1 und mi-1 auf. Das Verhältnis der mitochondrial synthetisierten Polypeptid-Untereinheiten zueinander ist bei sas-1 nahezu wie bei mi-1, d.h. bei selektiver Markierung wird Untereinheit 1 (siehe Analyse des Immunpräzipitats, Abb.16) sehr viel stärker markiert als die Untereinheiten 2 und 3, während diese beiden annähernd gleich stark markiert werden. Bei cni-1 fehlen die Polypeptid-Untereinheiten 2 und 3; Untereinheit 1 wird nur schwach markiert (9) oder auch gar nicht (bei in der frühen Log-Phase geernteten Zellen). Im Gegensatz zu den mitochondrial gebildeten Untereinheiten scheinen die an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisierten Untereinheiten bei allen drei Mutanten in ähnlichen Verhältnissen zueinander gebildet zu werden.
Der größte Unterschied zwischen sas-1 und mi-1 bzw. cni-1 besteht in den mitochondrialen Ribosomen. Aus sas-1-Mitochondrien kann im Gegensatz zu den beiden anderen Mutanten (13,21) genauso viel RNA wie aus Wildtyp-Mitochondrien extrahiert werden. Da der überwiegende Teil der mitochondrialen RNA als ribosomale RNA in den Ribosomen vorliegt, sollte der Gehalt an Ribosomen in den Mitochondrien von sas-1 mit demjenigen des Wildtyps übereinstimmen. Daß auch die Ribosomen als solche im Gegensatz zu denen von mi-1 und cni-1 intakt sind, legt das Dichtegradientenprofil der undissoziierten bzw. dissoziierten mitochondrialen Ribosomen (siehe Abb.18 und 19) nahe. Während bei sas-1 ein Ribosomenmuster wie beim Wildtyp zu beobachten ist, wird in den beiden anderen Mutanten die kleine ribosomale

Untereinheit nur in sehr geringem Umfang gebildet (13,21,22).

Über den genetischen Defekt in sas-1 ist, abgesehen vom Phänotyp und der Vererbung des Defektes, bis jetzt nichts bekannt. Nachdem die Mutante unter bestimmten experimentellen Bedingungen in den untersuchten Eigenschaften dem Wildtyp sehr ähnlich wird, muß man annehmen, daß die genetische Information zur Bildung von Cytochrom aa_3 und b zwar vorhanden ist, aber normalerweise nicht realisiert wird. Im Fall der Cytochromoxidase könnten die Ergebnisse am besten als gestörter Zusammenbau der vorhandenen Einzelkomponenten zu einem funktionsfähigen Komplex gedeutet werden. Für eine Mutation auf regulatorischer Ebene sprechen folgende Befunde:

1) Es fehlen zwei Cytochrome (Cytochrom aa_3, Abb.10, und ein b-Typ-Cytochrom, Abb.11).
2) Durch Wachstum bei höherer Temperatur läßt sich die Ausprägung der mutierten Merkmale in sas-1 stark unterdrücken, d.h. die Mutante wird phänotypisch dem Wildtyp ähnlich.
3) Alle Polypeptid-Untereinheiten der Cytochromoxidase werden synthetisiert. Das nachgewiesene Fehlen von Häm a muß nicht primär genetisch bedingt sein, sondern kann eine sekundäre Folge des gestörten Assemblierungsprozesses sein, wie man es z.B. bei Kupfer-frei gewachsenem Wildtyp beobachtet (9).

Auf Grund der genannten Eigenschaften kann diese Mutante für Temperatur-Shift-Experimente verwendet werden; d.h. Zellen, die zunächst bei 25°C gezüchtet wurden, werden bei 37°C weiterinkubiert. Aus den dabei beobachteten Zwischenprodukten der Assemblierung können möglicherweise wertvolle Erkenntnisse über die Biogenese eines supramolekularen Enzymkomplexes gewonnen werden.

4. EXPERIMENTELLER TEIL

4.1. Mutagenese und Selektion

4.1.1. Mutagenese

Konidien des Stammes 74 A (Wildtyp) wurden für 6 Stunden bei 20°C in 50 ml Vogel's Minimalmedium (23) mit 2% Saccharose als Kohlenstoffquelle (Inoculum: $8 \cdot 10^6$ Kon./ml Medium) auf einer Schüttelmaschine inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen mit Cycloheximid (Endkonzentration 100 µg/ml Medium) vergiftet und die Inkubation für weitere 40 Minuten fortgesetzt. Danach wurde der Kultur 2-Aminopurin (Endkonzentration 20 µg/ml Medium) zugesetzt und 2 Stunden inkubiert (24).
Anschließend wurden die Zellen durch Filtration auf einem Bakterienfilter (Sartorius, Porengröße 0,2 µm) gesammelt und dreimal mit sterilem Wasser gewaschen.

4.1.2. Selektion

4.1.2.1. Selektion durch selektive Wachstumshemmung

Das Bakterienfilter mit den Zellen wurde zu 300 ml Acetat-Minimalmedium (Vogel's Minimalmedium mit 50 mM NaAc) gegeben; nach homogener Verteilung der Zellen mit einem Magnetrührer wurde die Suspension gleichmäßig auf 6 Erlenmeyerkolben (200 ml) aufgeteilt und diese auf eine Schüttelmaschine gestellt.
Nach 35 Stunden Inkubation bei 20°C wurden zwei Filtrationsschritte durchgeführt (siehe auch Abb.1):

1) Filtration der Kultur (einzelne Zellen und Mycel im Medium) über ein Stoffilter (Kunstseide): Abtrennen des Mycels,
2) Filtration des Filtrates des ersten Schrittes (einzelne Zellen im Medium) über ein Bakterienfilter: Sammeln der Zellen.

Die Zellen auf dem Bakterienfilter wurden anschließend in frischem Medium suspendiert und zwar entweder in

- Acetat-Minimalmedium (Vogel's Minimalmedium mit 50 mM NaAc) oder in
- Saccharose-Minimalmedium (Vogel's Minimalmedium mit 2% Saccharose) mit 4 mM Salicylhydroxamat.

4.1.2.2. Selektion durch Kolonienwachstum und Überschichten mit Tetrazolium-haltigem Agar

Um ein Wachstum in Kolonien zu erreichen, wurden die Zellen auf Sorbose-haltigem Agar (1% Sorbose, Glucose und Fructose je 0,05%, 2% Agar, Vogel's Minimalmedium) in Petrischalen ausgestrichen.
Die gewachsenen Kolonien wurden mit Tetrazolium-haltigem Agar (0,5% 2,3,5triphenyl-2H-Tetrazoliumchlorid, 1,5% Agar, 0,1 M Na-Phosphat-Puffer pH 7,0) überschichtet und für 4 Stunden bei 40°C bebrütet.

4.1.3. Isolieren der Kolonien

Die Tetrazolium-negativen Kolonien wurden aus dem Agar ausgestochen und zum weiteren Wachstum und Konidienbildung auf Vollmedium (1% Glycerin, 1% Saccharose, 0,25% Hefeextrakt, 0,1% Caseinhydrolysat, 1,8% Agar, Vitaminlösung (25), Vogel's Minimalmedium) gegeben und für 5 bis 6 Tage bei 25°C inkubiert. Die Analyse der Kolonien ist in den Ergebnissen (2.1.2.4.) beschrieben.

4.2. Genetische Untersuchung

4.2.1. Kreuzung

Kreuzungsmedium in Petrischalen (Westergaard's Medium (26), 1,5% Saccharose, 50 µg/ml Pantothenat, 10 µg/ml Biotin, 1,5% Agar) wurde mit Konidien von pan-1 bzw. sas-1 inoculiert und bei Raumtemperatur im Dunklen stehengelassen. Nach 8 Tagen wurden die Protoperithezien von pan-1 durch Zugabe von einigen Tropfen einer Konidiensuspension von sas-1 ($1{,}0 \cdot 10^8$ Kon./ml) befruchtet.

4.2.2. Tetradenanalyse

Nach weiteren 12 Tagen waren die Perithezien der Kreuzung pan-1 x sas-1 ausgereift. Die Petrischalen mit den Perithezien wurden bei guter Beleuchtung für 30 Sekunden dicht (3 mm) über ein Agarblöckchen (4% Agar) gelegt, sodaß die ausgeschleuderten Sporen als Tetraden auf dem Agar zu liegen kamen. Das Blöckchen und alle zur Isolierung benötigten Instrumente wurden vor dem Gebrauch mit 1%iger NaClO-Lösung sterilisiert.
Die Isolierung der Tetraden erfolgte mit einer kapillar ausgezogenen Pasteurpipette unter dem Präpariermikroskop bei 25-facher Vergrößerung. Jede Ascospore wurde in ein Schrägagarröhrchen (2% Saccharose, 50 µg/ml Pantothenat, 1,5% Agar, Vogel's Minimalmedium) gegeben und zur weiteren Reifung für 3 Tage bei 25°C inkubiert. Durch einen einstündigen Hitzeschock bei 60°C wurden die Sporen aktiviert; innerhalb von 3 bis 4 Tagen keimten bei 25°C die meisten von ihnen aus.
Die Analyse der Cytochrome der aus den Sporen ausgekeimten Mycelien wurde mit dem Handspektroskop wie in den Ergebnissen beschrieben durchgeführt. Für die Flüssigkeitskulturen wurde Saccharose-Minimalmedium verwendet.

4.3. Biochemische Untersuchungen

4.3.1. Züchtung der Mutante

Die Mutante wurde in Vogel's Minimalmedium mit 2% Saccharose in sterilen Flaschen als submerse Kultur bei 25°C, bzw. bei 12°C und 37°C, in einem beleuchteten Raum gezüchtet. Als Inoculum dienten $1{,}0 \cdot 10^6$ Konidien/ml. Die Belüftung der Kulturen erfolgte über ein steriles Einleitungsrohr.
Als Proben für die Wachstumskurven wurden nach kräftigem Umschwenken der Flaschen jeweils 1 l bzw. 0,5 l im weiteren Verlauf entnommen. Das Mycel wurde über ein Papierfilter

abgenutscht und sofort weiter verarbeitet.

4.3.2. Extraktion des Biuret-positiven Proteins

Kleine Mycelstückchen vom Wildtyp und sas-1 wurden einige Tage bei 40°C getrocknet. Nach der Wägung (Trockengewicht) wurde jede Probe in flüssigem Stickstoff eingefroren und das spröde Material in einer Reibschale mit einem Mörser zerkleinert. Anschließend wurde es in 1 ml Biuret-Reagenz suspendiert und in einem Sorvall-Omnimix homogenisiert. Ungelöste Bestandteile wurden durch Zentrifugieren abgetrennt. Aus der Extinktion des Überstandes bei 546 nm wurde der spezifische Proteingehalt berechnet.

4.3.3. Messung des Sauerstoffverbrauchs

In Abb.25 sind die beiden Teile der Sauerstoffelektrode nach Clark, die Elektrode (Abb.25 A) und das Mikroreaktionsgefäß (Abb.25 B) dargestellt. Die Sauerstoffelektrode wurde nach Angaben von B. Brauser angefertigt.

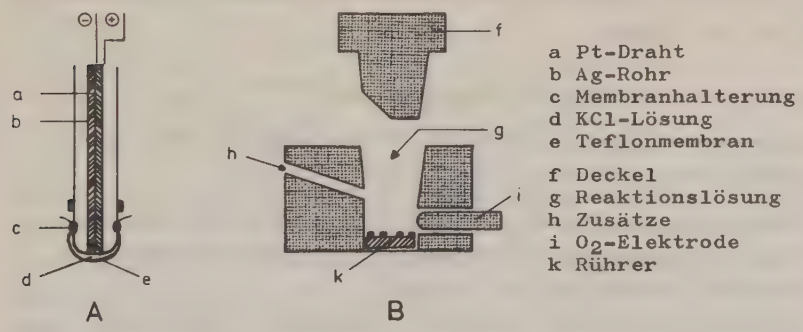


Abb.25
A: Die Sauerstoffelektrode besteht aus einer in Kunststoff eingebetteten Platinelektrode (Kathode (a)) und einer Ag/AgCl-Elektrode (Anode (b)), die als ein Ag-Rohr den Pt-Draht in Kunststoff umgibt. Die Elektrodenfläche des Rohres wird elektrolytisch mit AgCl beschichtet. In dem kapillaren Spalt (d) zwischen den beiden Elektroden und einer Sauerstoff-durchlässigen Teflonmembran (e), Dicke 12 µm, befindet sich eine KCl-Lösung. Die Membran steht auf der anderen Seite mit der Reaktionslösung in unmittelbarer Verbindung, sodaß wegen der kurzen Diffusionsstrecke und des unmittelbar darunterliegenden Rührers

stets die aktuelle Sauerstoffkonzentration in der zu untersuchenden Lösung gemessen werden kann.

B: Das Mikroreaktionsgefäß hat ein Volumen von 1 ml. Ein Magnetrührer (k) sorgt für die gleichmäßige Verteilung der Inhaltsstoffe und der durch die Bohrung (h) einpipettierten Zusätze. Die Elektrode (i) ist in einer zweiten Bohrung dicht über dem Rührer verschraubt.

Bei genügend großer Spannung (ca. 700 mV) wird aller Sauerstoff in unmittelbarer Nähe der Pt-Elektrode abgeschieden. Der dabei zwischen den Elektroden fließende Strom wird mit einem Nanoamperemeter gemessen und über einen Spannungsschreiber registriert.

Eine kleine Menge Mycel aus jeder Probe wurde sofort in eiskaltes Saccharose-Minimalmedium gegeben. Ein anderes Gefäß mit demselben Medium, das laufend mit Luft durchperlt wurde, stand in einem Wasserbad von 25°C.
Zur Messung wurde 1 ml luftgesättigtes Medium in das Reaktionsgefäß pipettiert, ein kleiner Teil des eisgekühlten Mycels (ca. 5 mg Feuchtgewicht) dazugegeben und sofort mit der Registrierung des Sauerstoffverbrauchs begonnen. Nach einigen Sekunden wurden 10 µl einer 100 mM KCN-Lösung in das Reaktionsgefäß einpipettiert, kurz danach 10 µl einer 200 mM SHAM-Lösung.

4.3.4. Präparation von Mitochondrien

Aus dem Mycel jeder Probe wurden Mitochondrien nach folgendem Schema präpariert (Arbeitstemp. 4°C):

- Suspension des Mycels in 10 Volumina (bezogen auf das Feuchtgewicht) Isolationsmedium (0,44 M Saccharose, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2)
- Grobe Zerkleinerung in einem Braun-Mixer (3 x 30 sek.)
- Zellaufschluß durch Mahlen des grob zerkleinerten Materials in einer Korundmühle (27)
- Gewinnung der Mitochondrien aus dem Homogenat durch Differentialzentrifugation (Sorvall-Zentrifuge, Rotor SS 34) :

  10 Minuten 4000 Upm: Sediment (Zellwände und Kerne) verwerfen; Überstand:

  5 Minuten 4500 Upm (Reinigungslauf): Sediment verwerfen; Überstand:

15 Minuten 12000 Upm: Mitochondrien im Sediment; Überstand verwerfen

- Aufnehmen der Mitochondrien in Na-Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 8,5) und kurzes Beschallen mit einem Branson-Sonifier, Mod. S 75, (Stufe 1) um die Mitochondrien homogen zu suspendieren.

4.3.5. Cytochromspektren der Mitochondrien

Die Differenzspektren der Cytochrome wurden bei Raumtemperatur mit einem Cary-Zweistrahlspektralphotometer (Mod. 118) aufgenommen.
Die Mitochondriensuspension in der Meßküvette wurde durch Zugabe von etwas Dithionit reduziert, diejenige in der Vergleichsküvette mit etwas Ferricyanid vollständig oxidiert.
Aus der Extinktionsdifferenz der Cytochrome bei den betreffenden Wellenlängen, dem molaren Extinktionskoeffizienten (siehe unten) und dem Proteingehalt in der Probe wurde der spezifische Proteingehalt berechnet.

Verwendete Extinktionskoeffizienten (red. - ox.):

- Cyt. aa_3: $\Delta\varepsilon_{605-630\,nm} = 24000\,M^{-1}\cdot cm^{-1}$ (28)
- Cyt. b : $\Delta\varepsilon_{560-575\,nm} = 23400\,M^{-1}\cdot cm^{-1}$ (29)
- Cyt. c : $\Delta\varepsilon_{550-542\,nm} = 18700\,M^{-1}\cdot cm^{-1}$ (30)

Tieftemperaturspektrum submitochondrialer Partikel
Submitochondriale Partikel wurden durch intensives Beschallen einer Mitochondriensuspension in Phosphatpuffer gewonnen (Branson-Sonifier, 10 x 10 Sek. Stufe 4).
Nach einer Reinigungszentrifugation (5 Minuten 5000 Upm) wurden die membrangebundenen Proteine von den Matrixproteinen durch Zentrifugieren abgetrennt (60 Minuten 50000 Upm, Spinco Ultrazentrifuge, Rotor TI-50).
Die Partikel wurden in Phosphatpuffer aufgenommen. Das Tieftemperaturspektrum wurde an einem Zweistrahlspektralphotometer nach M. Klingenberg aufgenommen. Die Partikelsuspension enthielt 0,5 M Saccharose. Das weitere Vorgehen war wie bei den Raumtemperaturspektren beschrieben.

4.3.6. Enzymaktivitäten

4.3.6.1. Enzymatische Aktivität der Cytochromoxidase

Herstellen von reduziertem Cytochrom c: 100 mg Cytochrom c aus Pferdeherz (Boehringer) in 2 ml Phosphatpuffer wurde durch Zugabe von einer Spatelspitze $NaBH_4$ reduziert. Das überschüssige Reduktionsmittel wurde durch Chromatographie des Cytochroms auf einer Bio-Gel P-2-Säule (1x10 cm) von diesem abgetrennt. Die Konzentration des reduzierten Cytochrom c, das im Enzymtest als Substrat dient, wurde über die Extinktion bei 550 nm ermittelt
($\varepsilon_{550\,nm\,(red.-ox.)} = 24\ mM^{-1} \cdot cm^{-1}$).

Enzymtest (Durchführung bei 25°C): Die bei diesem Test auftretende Extinktionsabnahme bei 550 nm (durch Oxidation von Cytochrom c bedingt) wurde mit einem Doppelstrahlspektralphotometer gemessen. Zum Testansatz wurden pipettiert in die

Meßküvette	Vergleichsküvette
1 ml Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,4)	1 ml Phosphatpuffer
20 µl red. Cytochrom c (Endkonz. 14,5 µM)	20 µl red. Cytochrom c
-------	10 µl KCN-Lösung (Endkonz. 1 mM)

Nach Beobachtung des Vorlaufes (2 Min.) wurde die Reaktion durch Zugabe von je 10 µl Mitochondriensuspension (Meß- und Vergleichsküvette) gestartet. Man beobachtete in allen Fällen eine Enzymkinetik 1. Ordnung. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion ausgewertet.

4.3.6.2. Enzymatische Aktivität der ATP-ase

Bei diesem Test wird die in einer bestimmten Zeit aus einer vorgegebenen ATP-Menge freigesetzte Menge an anorgan. Phosphat bestimmt. Die Messungen wurden nach der von Tzagoloff angegebenen Methode durchgeführt (31).

4.3.7. Markierung der Zellproteine und der mitochondrialen Translationsprodukte

Homogene Markierung der Zellproteine mit ^{3}H-Leucin: Zu einer 21 Stunden alten Kultur von sas-1 (0,5 Liter, bei 25°C gewachsen) wurde 1 mCi ^{3}H-Leucin gegeben und die Kultur für weitere 3 Stunden belüftet. Nach dem Abnutschen des Mycels wurden Mitochondrien präpariert.

Doppelmarkierungs-Experiment: Zu einer 21 Stunden alten Kultur von sas-1 (0,5 Liter) wurden 10 µCi ^{14}C-Leucin gegeben und die Kultur für weitere 3 Stunden belüftet, um eine homogene Markierung der Zellproteine zu erreichen. Danach wurden die Zellen mit Cycloheximid (0,1 mg/ml) vergiftet und genau 2 Minuten später 2 mCi ^{3}H-Leucin zugesetzt. Nach einer Stunde wurde das Mycel abgenutscht und Mitochondrien präpariert.

4.3.8. Mitochondriale Translationsprodukte und Immunpräzipitation

Mitochondriale Translationsprodukte: Aus Mitochondrien, deren Proteine spezifisch mit ^{3}H-Leucin (siehe Doppelmarkierungs-Experiment) markiert worden waren, wurden zur Entfernung von freiem ^{3}H-Leucin mitochondriale Membranen (=submitochondriale Partikel, Präparation siehe 4.3.5.) präpariert und in SDS-haltigem Puffer aufgenommen. Die Auftrennung der Translationsprodukte erfolgte durch eine SDS-Gelelektrophorese.

Immunpräzipitation: Die Fällung der Polypeptid-Untereinheiten von Cytochromoxidase mit einem Antikörper gegen das gesamte Enzym (32) wurde wie folgt durchgeführt:

- sas-1- und nicht markierte Wildtyp-Mitochondrien (0,5 mg bzw. 1 mg Protein) werden gemischt. Die Zugabe der nicht markierten Wildtyp-Mitochondrien zu den markierten Mutanten-Mitochondrien dient dazu, die Konzentration an Antigen (=Cytochromoxidase bzw. deren Polypeptid-Untereinheiten) zu erhöhen und somit ein leicht zu handhabendes Immunpräzipitat zu erhalten.

- Lyse der Mitochondrien in 2% Triton-Na-Phosphatpuffer (100 mM, pH 8,0)
- Reinigungszentrifugation (Sorvall-Zentr.): 30 Minuten bei 20ooo Upm zur Sedimentation nicht lysierter Mitochondrien und Verunreinigungen
- Bestimmung des Volumens des Überstandes
- Zugabe von 0,2 ml Antiserum gegen gesamte Cytochromoxidase zu dem Tritonextrakt
  Stehenlassen des Ansatzes bei 4°C für ca. 12 Stunden
- Abzentrifugieren des Immunpräzipitats in einer Tischzentrifuge; Verwerfen des Überstandes
- Waschen des Präzipitats: 2mal mit 1% Triton-Na-Phosphatpuffer
  2mal mit Na-Phosphatpuffer
  Abzentrifugieren des Präzipitats; Verwerfen des Waschüberstandes
- Aufnehmen des Präzipitats in 40 µl SDS-Tris-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1% SDS, 0,5% Mercaptoäthanol)
- Bestimmung der Radioaktivität in einem Aliquot des solubilisierten Immunpräzipitats
- Auftragen einer Probe mit ausreichender Aktivität (ca. 10ooo cpm) auf ein Polyacrylamid-Gel und Elektrophorese

4.3.9. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Herstellung der Gele: Für alle Elektrophoresen wurden 15%ige Gele verwendet, die aus folgenden Lösungen polymerisiert wurden:

1) 12 g Acrylamid
   320 g Bisacrylamid
   100 µl Tetramethyläthylendiamin
   ad 60 ml SDS-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1% SDS)
2) 100 mg Ammoniumperoxodisulfat ad 20 ml Wasser

Die beiden Lösungen wurden bei Eistemperatur gemischt und in zerlegbare Kunststofformen (200x85x4 mm) mit vorgeformten Auftragsspalten gegossen. Nach der Polymerisation wurden die Gele mindestens 12 Stunden mit Elektropho-

resepuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1% SDS) äquilibriert.

Elektrophorese: Da es bei der elektrophoretischen Auftrennung der Proben nur auf die Radioaktivität in den Proteinen ankam (und nicht auf die Proteinkonz.) wurden auf die Gele Proben mit ausreichender Radioaktivität (ca. 10ooo cpm) aufgetragen. Nachdem die Proben bei einer Feldstärke von 6 V/cm in das Gel eingewandert waren, wurde die Feldstärke auf 12 V/cm erhöht. Das Gel wurde beiderseits durch Leitungswasser (ca. 12°C) gekühlt. Die Elektrophorese wurde abgebrochen, wenn das mitlaufende Cytochrom c 5,5 cm von der Auftragsstelle entfernt war.

Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung im Gel: Aus dem Gel wurde, von der Auftragsspalte aus gerechnet, ein 8 x 1 cm langer Streifen ausgestanzt und dieser mit einem speziellen Gelschneider in 1 mm dicke Scheibchen (insgesamt 70) geschnitten. Die Gelscheiben wurden zu je 0,2 ml SDS-Tris-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1% SDS) in einem Nethelerbecher gegeben und 12 Stunden bei 60°C inkubiert (in dieser Zeit diffundiert das Protein aus dem Gel). Nach dem Abkühlen wurde in jedes Gefäß 1 ml Scintillatorflüssigkeit (700 ml Toluol, 300 ml Triton X-100, 6 g Permablend) pipettiert und die Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen in einem Packard-Tricarb-Scintillationszähler gemessen. Die Zählausbeute betrug bei Zählung eines Isotops 30% (^{3}H) bzw. 40% (^{14}C). Bei Simultanzählung von ^{3}H und ^{14}C war sie 10% bzw. 20%.

4.3.10. Extraktion von Häm a und Protohäm aus Mitochondrien

Mitochondrien (15 mg bis 20 mg Protein) wurden dreimal mit neutralem Aceton-Wasser-Gemisch (8:2, v/v) gewaschen. Die Extraktion von Häm a und Protohäm aus dem Proteinpräzipitat erfolgte zweimal mit saurem Aceton-Wasser-Gemisch (8:2, v/v, mit konz. HCl auf pH 2-3 eingestellt). Die vereinigten Extrakte wurden am Rotationsverdampfer eingedampft. Die zurückgebliebenen Porphyrine wurden in alkalischem Pyridin-Wasser (1:2, v/v, pH 11) aufgenommen, mit Dithionit

reduziert und das Spektrum der gebildeten Pyridin-Hämochromogene aufgezeichnet.

4.3.11. Bestimmung des RNA-Gehaltes der Mitochondrien

Mitochondrien (0,6 mg bis 1,0 mg Protein) wurden zu kalter Perchlorsäure (Endkonz. 0,2 N) pipettiert und das gefällte Protein zweimal mit 0,2 N Perchlorsäure gewaschen. Das Protein wurde wieder in 0,2 N Perchlorsäure aufgenommen und eine Probe für 10 Minuten bei 100°C (Wasserbad) hydrolysiert, während die zweite Probe (Blindwert) nicht erhitzt wurde. Nach dem Abkühlen der Probe in Eiswasser wurde das Protein wieder abzentrifugiert und das UV-Spektrum der Überstände aufgezeichnet. Der RNA-Gehalt wurde aus der Extinktionsdifferenz $\Delta E_{260-310\,nm}$ berechnet (21).

4.3.12. Präparation von mitochondrialen Ribosomen und ribosomalen Untereinheiten

Ribosomen und ribosomale Untereinheiten wurden aus 24 Stunden alten Kulturen von sas-1 gewonnen.
Die Präparation der Ribosomen wurde nach folgendem Schema durchgeführt (Arbeitstemp. 4°C):

- Isolierung von Mitochondrien (siehe Schema 4.3.4.)
- Aufnehmen der Mitochondrien in AMT-Puffer (100 mM NH_4Cl, 10 mM $MgCl_2$, 30 mM Tris-HCl, pH 7,4) und Lysieren durch Zusatz von Triton X-100 (Endkonz. 2%)
- Reinigungszentrifugation des Lysats für 20 Minuten bei 20ooo Upm (Sorvall Zentr., Rotor SS 34) zur Sedimentation nicht lysierter Mitochondrien und Verunreinigungen
- Überschichten eines Saccharosekissens (2 ml 48% Sacch. in AMT, w/w) in einem Nitrozellulose-Röhrchen (Beckmann 15 x 75 mm) mit dem Lysat
- Sedimentation der Ribosomen durch das Kissen bei 50ooo Upm für 2 Stunden (Spinco Ultrazentrifuge, Rotor TI-50)
- Aufnehmen der Ribosomen in 50-100 µl AMT-Puffer, resuspendieren und zur Entfernung von Verunreinigungen 1 Minute in einer Tischzentrifuge zentrifugieren

- Messung des RNA-Gehaltes der Ribosomensuspension bei 260 nm (=Optische Dichte -OD-)
  Definition: 1 OD ist diejenige Menge an Ribosomen, die bei einer Wellenlänge von 260 nm und bei einer Schichtdicke von 1 cm die Extinktion 1,0 hat.
  1 OD ≙ 40 µg RNA (21)
- Auftragen einer Probe, entsprechend 28 µg bis 60 µg RNA, auf einen Saccharose-Dichtegradienten
- Zentrifugieren des Gradienten bei 40ooo Upm für 2 Stunden (SW-Rotor)
- Analyse des Gradienten durch Messung der Extinktion bei 260 nm mit einer Durchflußküvette in einem Zeiss-Photometer (PMQ 2)

Die Präparation der ribosomalen Untereinheiten erfolgte bis zur Sedimentation der Ribosomen wie für die mitochondrialen Ribosomen beschrieben, jedoch enthielt das Isolationsmedium zur Präparation der Mitochondrien und der AMT-Puffer, in dem die Mitochondrien aufgenommen wurden, 0,5 mg Heparin/ml.
Die Ribosomen wurden statt in AMT- in AT-Puffer (100 mM NH_4Cl, 30 mM Tris-HCl, pH 7,4) aufgenommen und zur Dissoziation der Ribosomen in ihre Untereinheiten dreimal bei -20°C eingefroren und wieder aufgetaut.
Nach der Messung des RNA-Gehaltes der Lösung wurde eine Probe, entsprechend 36 µg bis 52 µg RNA, auf einen Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen und bei 40ooo Upm für 4 Stunden zentrifugiert.
Anschließend wurde der Gradient wie beschrieben analysiert.

Herstellen eines konvexen Saccharose-Dichtegradienten nach Noll (33)
Gradient zur Auftrennung von Ribosomen: Zu 10 ml Vorlage einer 10,25%igen Saccharose in AMT (w/w) wird kontinuierlich 48%ige Saccharose in AMT (w/w) aus einem Reservoir gepumpt. Nach 19 Minuten hat der Gradient sein endgültiges Volumen von 11 ml. Der Saccharose-Dichtegradient reicht von 10,25% bis 34% Saccharose.

Gradient für ribosomale Untereinheiten: Vorgelegt werden nur 9 ml 10,25%ige Saccharose in AMT (w/w) und aus dem Reservoir wird kontinuierlich 40%ige Saccharose in AMT (w/w) zugepumpt. Das Volumen des Gradienten beträgt bei gleicher Füllungszeit ebenfalls 11 ml. Der Saccharose-Dichtegradient reicht von 10,25% bis 27% Saccharose.

Kontinuierliche Messung der Extinktion bei 260 nm mit einer Durchflußküvette durch Auspumpen des Gradienten: Das Zentrifugenröhrchen mit dem Gradienten wurde zum Auspumpen in einem Kunststoffrohr verschraubt. Mit einem hohlen Dorn, durch den ständig 50%ige Saccharoselösung zugepumpt wurde, wurde der Boden des Röhrchens durchstossen. Die nachfließende, spezifisch viel schwerere Zuckerlösung drückte den Gradienten über eine Schlauchverbindung durch eine Durchflußküvette, die im Strahlengang des Photometers stand.

4.3.13. Proteinbestimmung

Protein wurde nach der Biuret-Methode von Beisenherz et al. (34) und nach der Methode von Lowry (35) bestimmt.

4.3.14. Materialien

Radioaktiv markiertes Leucin: NEN, New England Nuclear Chemicals GmbH

Cycloheximid: Carl Roth, Karlsruhe

Salicylhydroxamat: Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.

ATP, Cytochrom c (aus Pferdeherz): Boehringer, Mannheim

SDS, Acrylamid, Bisacrylamid, Tetramethyläthylendiamin, Permablend, Tetrazoliumchlorid, Heparin-Na, 2-Mercaptoäthanol: Serva GmbH, Heidelberg

Saccharose, Fructose, Glucose, Sorbose, Agar-Agar, Caseinhydrolysat, Hefeextrakt, Tris-HCl, EDTA, Lösungsmittel und Salze (p.A.): Merck AG, Darmstadt

Triton X-100: Packard Instruments, Frankfurt

Bio-Gel P-2: Bio-Rad Laboratories, München

Äthylenglycolmonomethyläther: Farbwerke Höchst AG, Gendorf

Toluol: ARAL AG, Ingolstadt

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zunächst wurde eine Selektionsmethode für Cytochromoxidase-deficiente Mutanten erarbeitet; eine der selektierten Mutanten (sas-1) wurde dann unter genetischen, morphologischen und biochemischen Gesichtspunkten untersucht.

5.1. Selektionsmethode: Das ausgearbeitete Schema besteht aus 4 aufeinanderfolgenden Schritten:

a) Selektion durch Acetat
b) Selektion durch Salicylhydroxamat
c) Selektion durch Tetrazoliumsalz
d) Selektion durch Spektralanalyse von Mycelien

5.2. Genetische Untersuchung: Die Tetradenanalyse der Kreuzung von sas-1 mit einer Auxotrophiemutante (pan-1 x sas-1) ergab, daß der genetische Defekt in sas-1 extrachromosomal vererbt wird. Die reziproke Kreuzung gelang nicht, da sas-1 keine Protoperithezien bildete.

5.3. Morphologische Untersuchung: Elektronenoptische Aufnahmen von Dünnschnitten des Mycels zeigen ein schwach ausgeprägtes endoplasmatisches Reticulum und eine, verglichen mit dem Wildtyp, weniger starke Zellwand. Der letztere Befund wurde durch die Bestimmung des Biuret-positiven Proteins erhärtet.

5.4. Biochemische Untersuchungen
Folgende Eigenschaften von sas-1 unterscheiden sich wesentlich von denen des Wildtyps:
Sowohl die Absorptionsbande von Cytochrom aa_3 (605 nm) als auch die von Cytochrom b (559 nm) fehlen in bei Raumtemperatur aufgenommenen Absorptionsspektren der Mitochondrien; die Bande von Cytochrom $c+c_1$ (550 nm) ist vorhanden. In Tieftemperaturspektren ist auch ein Cytochrom vom b-Typ (556 nm) nachzuweisen, während die Absorptionslinie von Cytochrom $b_{562\,nm}$ fehlt.
Die Atmung der Mycelien aus einer exponentiell wachsenden Kultur war durch Cyanid (1 mM) nicht zu beeinflussen;

durch Zugabe von Salicylhydroxamat (2 mM) wurde die Atmung jedoch fast vollständig gehemmt.
Die spezifische Aktivität der Cytochromoxidase (Oxidation von reduziertem Cytochrom c) betrug mit 0,13 U/mg etwa 7% derjenigen des Wildtyps.
Mit einer immunologischen Technik wurde nachgewiesen, daß alle Polypeptid-Untereinheiten der Cytochromoxidase, wenn auch in anderen Relationen wie beim Wildtyp, gebildet werden. Der spezifische Häm a -Gehalt der Mitochondrien entsprach mit 0,03 nmol/mg ungefähr 6% desjenigen des Wildtyps.

Keine Unterschiede zum Wildtyp waren bei
der Oligomycin-sensitiven ATP-ase-Aktivität,
dem spezifischen RNA-Gehalt der Mitochondrien sowie
dem Sedimentationsprofil der mitochondrialen Ribosomen
festzustellen.

5.5. Unter bestimmten experimentellen Bedingungen ist die für sas-1 charakteristische Ausprägung (Cytochrom-Defi-cienz) reversibel. Die bei höherer Temperatur (37°C) ge-züchtete Mutante zeigt eine vollständige Atmungskette und eine Cyanid-sensitive Atmung. Auf diese Weise können in der Mutante charakteristische Eigenschaften des Wildtyps induziert werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

(1) Borst, P. (1972) Ann. Rev. Biochem. 41, 333-376.

(2) Schatz, G. and Mason, T.L. (1974) Ann. Rev. Biochem. 43, 51-87.

(3) Gillham, N.W. (1974) Ann. Rev. Genetics 8, 347-391.

(4) Sebald, W., Schwab, A.J. and Bücher, Th. (1969) in 20. Coll. der Ges. für Biol. Chemie (Hrsg. Th. Bücher und H. Sies); Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 140-154.

(5) Schwab, A.J. (1972) Dissertation, Universität München.

(6) Weiss, H., Sebald, W. and Bücher, Th. (1971) Eur. J. Biochem. 22, 19-26.

(7) Mason, T.L. and Schatz, G. (1973) J. Biol. Chem. 248, 1355-1360.

(8) Rubin, M.S. and Tzagoloff, A. (1973) J. Biol. Chem. 248, 4275-4279.

(9) Werner, S., Schwab, A.J. and Neupert, W. (1974) Eur. J. Biochem. 49, 607-617.

(10) Ebner, E., Mason, T.L. and Schatz, G. (1973) J. Biol. Chem. 248, 5369-5378.

(11) Edwards, D.L. and Kwiecinski, F. (1973) J. Bacteriol. 116, 610-618.

(12) Bertrand, H., Szakacs, N.A., Nargang, F.E., Zagozeski, C.A., Collins, R.A. and Harrigan, J.C. (1976) Can. J. Genet. Cytol. 18, 397-409.

(13) Kientsch, R. and Werner, S. (1976) in Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria (Bücher, Th. et al. eds.) pp. 247-252, North-Holland, Amsterdam,London.

(14) Edwards, D.L., Kwiecinski, F. and Horstmann, J. (1973) J. Bacteriol. 114, 164-168.

(15) Shannon, C., Enns, R., Wheelis, L., Burchiel, K. and Criddle, R. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3004-3011.

(16) Manocha, M.S. and Ross Colvin, R. (1967) J. Bacteriol. 94, 202-212.

(17) Jagow, G. von, Weiss, H. and Klingenberg, M. (1973) Eur. J. Biochem. 33, 140-157.

(18) Werner, S. (1976) Habilitationsschrift, Universität München.

(19) Lehninger, A.L. (1975) Biochemistry, pp. 946-947.

(20) Henry, M.-F. and Nyns, E.J. (1975) Sub-cell. Biochem. 4, 1-65.

(21) Rifkin, M.R. and Luck, D.J.L. (1971) Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A. 68, 287-290.

(22) Neupert, W., Massinger, P. and Pfaller, A. (1971) in Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts (Boardman, N.K., Linnane, A.W. and Smillie, R.M. eds.) pp. 328-338, North-Holland, Amsterdam-London.

(23) Vogel, H.J. (1964) Am. Nat. 98, 435-446.

(24) Rosenberg, E., Mora, Chr. and Edwards, D.L. (1976) Genetics 83, 11-24.

(25) Sebald, W. (1969) Dissertation, Universität München.

(26) Westergaard, M. and Mitchell, H.K. (1947) Am. J. Bot. 34, 573-577.

(27) Weiss, H., Jagow, G. von, Klingenberg, M. and Bücher, Th. (1970) Eur. J. Biochem. 14, 75-82.

(28) Gelder, B.F. van (1966) Biochim. Biophys. Acta 118, 36-46.

(29) Zaugg, W.S. and Rieske, J.S. (1962) Biochem. Biophys. Res. Commun. 9, 213-217.

(30) Margoliash, E. and Frohwirt, N. (1959) Biochem. J. 71, 559-572.

(31) Tzagoloff, A. (1969) J. Biol. Chem. 244, 5020-5026.

(32) Werner, S. (1974) Eur. J. Biochem. 43, 39-48.

(33) Noll, H. (1967) Nature 215, 360-363.

(34) Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Czock, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E. und Pfleiderer, G. (1953) Z. Naturforschg. 8 b, 555-577.

(35) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, D.L. and Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.

LEBENSLAUF

21. Mai 1953	Klaus-Peter Bruckmooser, geboren am in München als Sohn von Dr.med. Max Bruckmooser, Facharzt für Röntgenologie und Strahlenheilkunde, und seiner Ehefrau Erika, geb. Barreau, Dipl. Phys.
Dez. 1960	Tod des Vaters
1971	Befreiung vom Wehrdienst
1959-1963	Volksschule in München
1963-1971	Humanistisches Gymnasium am Kolleg Stella Matutina in Feldkirch
Juni 1971	Abitur
Sommer 1971	Zweimonatiger Krankenpflegedienst
1971-1972	Ein Semester Studium der Chemie
seit 1972	Studium der Humanmedizin an der Universität München; voraussichtlicher Abschluß März 1978
Sept. 1974	Physikum
Aug. 1975	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Nov.75-Dez.76	Doktorarbeit am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr.rer.nat. Dr.med.h.c. Th. Bücher und Herrn Priv.-Doz. Dr.med. S. Werner.
März 1978	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Apr.78-März 79	Praktisches Jahr mit Urologie als Freiem Fach
8. Mai 1979	Abschluß des Studiums mit dem Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung